

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON

- MEDECINE -

U. E. R. SUD-OUEST

Année 1977 - N° 317

**ETUDE DES ANTICORPS ANTIINSULINE
CHEZ 440 DIABETIQUES
INSULINODEPENDANTS**

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

et soutenue publiquement le 1^{er} Juillet 1977

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Ghislaine SABBEN

née le 29 Août 1946

à CONSTANTINE (Algérie)

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON

- MEDICINE -

U. S. R. SUD-OUEST

Année 1972 - 73

ETUDE DES ANTICORPS ANTIINSULINE
CHEZ 440 DIABETIQUES
INSULINODEPENDANTS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

et soutenue publiquement le 1^{er} juillet 1972

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Ghislaine SABBEN

née le 29 Août 1949

https://archive.org/details/IA41554225_0025

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON
- MEDECINE -
U. E. R. SUD-OUEST

Année 1977 - N°

**ETUDE DES ANTICORPS ANTIINSULINE
CHEZ 440 DIABETIQUES
INSULINODEPENDANTS**

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

et soutenue publiquement le 1^{er} Juillet 1977

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Ghislaine SABBEN

née le 29 Août 1946

à CONSTANTINE (Algérie)

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON

- MEDICINE -

U. E. R. SUD-OUEST

Année 1977 - 78

ETUDE DES ANTICORPS ANTIINSULINE
CHEZ 440 DIABETIQUES
INSULINODEPENDANTS



THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

et soutenue publiquement le 1^{er} Juillet 1977

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Ghislaine SABBEN

née le 29 Août 1946

à CONSTANTINE (Algérie)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

=====

Président de l'Université : Mr le Pr D. GERMAIN
Premier Vice-Président : Mr le Pr E. ELBAZ
Deuxième Vice-Président : Mr B. ROUSSET, Chercheur
Troisième Vice-Président : Mr R. LOPEZ, Etudiant
Secrétaire Général : Mr J. RAMBAUD, Administrateur Civil

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE L'UNIVERSITE

Médecine : GRANGE-BLANCHE : Directeur : Mr le Dr B. SALLE (M.C.A.)
ALEXIS-CARREL : Directeur : Mr le Pr R. MORNEX
SUD-OUEST : Directeur : Mr le Pr J. NORMAND
LYON-NORD : Directeur : Mr le Dr J.P. NEIDHARDT
Directeur Honoraire : Mr le Pr A. BERTOYE

Biologie Humaine : Mr le Dr J.P. REVILLARD (M.C.A.)

Technique de Réadaptation : Mr le Dr A. MORGON (M.C.A.)

Sciences Pharmaceutiques : Mr le Pr BIZOLLON

Sciences Odontologiques : Mr le Dr R. VINCENT

Institut Régional d'Education Physique et Sportive :

Président du conseil d'U.E.R. : Mr le Pr R. GUILLET
Directeur : Mr A. MILLON

Mathématiques : Mr le Pr E. COMBET

Physique : Mr le Pr J. DELMAU

Chimie et Biochimie : Mr le Pr J. HUET

Sciences de la nature : Mr le Pr R. GINET

Sciences Physiologiques : Mle le Pr J.F. WORBE

I.U.T. n° 1 : Mr le Pr B. POUYET

I.U.T. n° 2 : Mr J. GALLET (Directeur ENSAM)

Observatoire : Mr G. MONNET (Astronome Adjoint)

Physique Nucléaire : Mr le Pr GUSAKOW

Mécanique : Mle le Pr G. COMTE-BELLOT

U.E.R. DE MEDECINE LYON SUD QUEST

PROFESSEURS TITULAIRES :

=====

Neurologie : Mr. AIMARD Gilbert

Clinique Pneumo-Phtisiologique : Mr. BRUN Jacques

Dermatologie : Mr. COLOMB Daniel

Clinique Chirurgicale : Mr. GUILLEMIN Georges

Clinique Chirurgicale : Mr. LATARJET Michel

Cancérologie : Mr. MAYER Marcel

Cardiologie : Mr. NORMAND Jean

Gynécologie Obstétrique : Mr. NOTTER Armand

Radiologie : Mr. PINET Edouard

Endocrinologie et Médecine Interne : Mr. PLAUCHU Marcel

Chaire de Génétique Médicale : Mr. ROBERT Jacques

Médecine Interne- Médecine du travail : Mr. TOLOT François

Médecine Médicale - Maladies de l'appareil digestif : Mr. VACHON Alphonse

Chaire de Biochimie appliquée : Mr. VINCENT Daniel

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

=====

Anatomie : Mr. BRAILLON Georges

Pédiatrie : Mr. GILLY Robert

Neuro-Chirurgie : Mr. LAPRAS Claude

Biochimie : Mr. LOUISOT Pierre

Biophysique : Mr. MORET Robert

Pneumo-Phtisiologie : PERRIN FAYOLLE Max

Mathématiques - Statistiques - Informatique : Mr. SITE Jean

Bactériologie - Virologie : Mr. VIALLIET-RAYNARD Jean

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES :

=====

Urologie : Mr. ARCHIMBAUD Jean-Pierre
Chirurgie Générale : Mr. BERARD Philippe
Maladies Infectieuses : Mr. BERTRAND Jean Louis
Ophtalmologie : Mme BONNET Mireille
Rhumatologie : Mr. BOUVIER Maurice
Physiologie : Mr. CABANAC Michel
Radiologie : Mr. CROISTILLE Marc
Neuro-Psychiatrie : Mr. DE VILLARD Régis
Histologie : Mr. DUBOIS Paul
O.R.L. : Mr. HAGUENAUER Jean-Paul
Médecine Expérimentale : Mr. JEANNEROD Marc
Hémobiologie : Mr. JOUVENCEAUX André
Stomatologie : Mr. LAIR Jacques
Médecine Interne : Mr. LEVRAT Roger
Séméiologie Chirurgicale : Mr. LOMBARD PLATET Roger
Anesthésiologie : Mr. MICHEL Albert
Chirurgie Infantile : Mr. MOLLARD Pierre
Séméiologie Médicale : Mr. PALIARD Pierre
Chirurgie Générale : Mr. REBOUILLAT Jacques
Néphrologie : Mr. REVILLARD Jean-Pierre
Anatomie Pathologique : Mr. ROCHET Michel
Pédiatrie : Mr. ROMAGNY Gabriel
Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire : Mr. TERMET Hubert
Médecine Interne : Mr. TETE Roger
Gynécologie Obstétrique : Mr. THOULON Jean-Marie
Cardiologie : Mr. TOUBOUL Paul
Neurologie : Mr. TRILLET Marc

Examineurs de la thèse :

- Président : Monsieur le Professeur M. PLAUCHU

- Assesseurs : Monsieur le Professeur R. MORNEX

Monsieur le Professeur Agrégé Y. MINAIRE

Monsieur le Professeur Agrégé Ch. A. BIZOLLON

A MES PARENTS,

A TOUTE MA FAMILLE.

A MES AMIS :

CATHERINE TOUILLON,

Nous avons poursuivi nos études dans un
climat fort sympathique.

Qu'elle soit assurée de mon amitié.

PASCALE, BRIGITTE ET JEAN-YVES BAUCHU,

MARTINE ET PIERRE SEGUIN,

LUISE ET JEAN FRANCOIS POUSSEL,

Leur franche camaraderie m'est précieuse.
Nos séances de travail resteront un
excellent souvenir.

Luise et Jean-François, par la traduction
de publications allemandes, ont contribué
à ce travail : nous les en remercions vi-
vement.

A notre Maître et Président de Thèse,

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. PLAUCHU,

Notre premier semestre d'externe s'effectue dans son service. D'emblée, il nous impressionne par l'étendue de son savoir et son talent clinique.

Bienveillant et profondément humain, il se préoccupe d'abord de l'intérêt du malade. Passionné par son métier, toujours dynamique, il encourage ses étudiants car "La Médecine, c'est difficile".

A la fin de ce stage, il nous inspire ce travail : depuis, il nous a toujours guidée. Il met à notre disposition ses documents, son temps précieux et nous prodigue ses conseils avec une grande bonté.

Nous voulons lui dire toute notre gratitude et l'assurer de notre respectueux attachement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. MORNEX,

Nous sommes touchée du grand honneur qu'il nous accorde en acceptant de juger notre travail. Nous connaissons sa haute compétence et ses multiples activités.

Nous le remercions de siéger aujourd'hui parmi nos juges. Nous le prions de croire à notre profond respect.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGÉ Y. MINAIRE,

Nous sommes très honorée de le compter
parmi nos juges.

Nous avons eu la chance de suivre son enseignement à la faculté : ses cours, d'une clarté remarquable, sont à l'origine de notre admiration.

En maintes circonstances, il nous a toujours conseillée et encouragée avec une extrême bienveillance, nous consacrant son temps très précieux.

Nous aimerions lui exprimer toute notre reconnaissance et l'assurer de notre respectueux dévouement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE CH.A. BIZOLLON,

Nous sommes très heureuse qu'il soit parmi
nos juges.

Il nous a accueillie dans son service avec une
très grande cordialité.

L'étendue de ses connaissances, son expérience
en matière de radioimmunologie nous ont permis
de réaliser ce travail dans d'excellentes con-
ditions.

Nous le remercions sincèrement de sa bienveil-
lance et de la confiance qu'il nous a témoignées,
durant ces années passées dans son laboratoire.

Nous voulons l'assurer de notre très respectueux
attachement.

MONSIEUR LE DOCTEUR J. KRESSMANN,

Il nous a fait bénéficier de sa grande compétence pour l'élaboration de ce travail.

Nous avons particulièrement apprécié sa disponibilité, la clarté de ses exposés, sa délicatesse.

Nous aimerions lui dire notre gratitude et l'assurer de notre sympathie.

MONSIEUR LE DOCTEUR A. FAURE,

MONSIEUR LE DOCTEUR R. COHEN,

Ils ont, de par leurs connaissances en matière de statistiques, contribué activement à notre travail.

Nous les remercions de leur constante amabilité.

Dans le Service de Monsieur le Professeur PLAUCHU, nous remercions :

Mesdames Marie TSCHORA, Dominique REY et Mauricette LEROY,

Mesdames Bernadette GODOT et Marie Thérèse MANTEAUX,

Elles ont uni leurs efforts pour convoquer les malades consultants et pratiquer leurs prélèvements. Elles m'ont toujours reçue avec une grande gentillesse.

Qu'elles soient assurées de ma sympathie.

Toutes les Infirmières des Services Sainte-Anne, Sacerdos et Savy,

Notre travail a pu être réalisé grâce à elles. Attentives, connaissant parfaitement leurs malades, elles m'ont toujours accueillie avec une cordialité que je n'oublie pas.

De chacune d'elle elles, je garde un excellent souvenir.

Dans le Service de Monsieur le Professeur BIZOLLON.

Notre travail s'est déroulé dans un climat très amical. Nous en remercions toutes *les personnes du laboratoire*, sans omettre quiconque.

Successivement, au cours de ce travail, m'ont aidée :

*Mesdames Odile BLANCHARD, Jocelyne DAHAN, Chantal LAISSARD,
Annie PROST, Bernadette BIZOLLON,*

Leur collaboration très efficace m'a été précieuse.

Je les remercie personnellement et les assure de ma sympathie.

Nous remercions :

les membres du Laboratoire NOVO

pour leur aimable collaboration, tout au long de ce travail.

- E T U D E D E S A N T I C O R P S A N T I I N S U L I N E

C H E Z 4 4 0 D I A B E T I Q U E S I N S U L I N O D E P E N D A N T S -

Travail du Service de Médecine Interne : Professeur PLAUCHU

et du Service de Radiopharmacie Radioanalyse : Professeur BIZOLLON

- I N T R O D U C T I O N -

L'étude des anticorps antiinsuline permet d'aborder deux problèmes intéressants :

- . le premier concerne l'analyse de la réaction insuline-anticorps antiinsuline ;
- . le second est consacré à la recherche des anticorps antihormones chez le diabétique insulino-dépendant.

Cet exposé comprendra quatre chapitres :

- Le premier chapitre rappelle un certain nombre de généralités : l'historique et la nature des anticorps antiinsuline, la réaction antigène anticorps et sa représentation mathématique ; les principales méthodes de détection des anticorps antihormones y sont rapportées.
- Le second chapitre est réservé à la méthodologie. Il comprend la mise au point de l'électroimmunodiffusion utilisée pour ce travail, l'étude de ses caractéristiques. Une discussion clot ce chapitre, et tente de justifier le choix de cette méthode.
- Le troisième chapitre rend compte des résultats obtenus des anticorps antihormones chez le diabétique insulino-dépendant :
 - . Recherche et titre des anticorps antiinsuline chez 440 diabétiques II, selon les besoins en insuline, la préparation d'insuline injectée.
 - . Détermination des constantes d'affinité et du nombre de sites des anticorps antiinsuline.
 - . Détection des anticorps antiproinsuline chez 100 diabétiques insulino-dépendants.
- Le quatrième chapitre fait place à la discussion :
 - . de nos résultats obtenus pour les groupes de malades considérés ;
 - . des facteurs éventuellement responsables de l'élaboration d'anticorps antihormones ;
 - . de l'intérêt de cette étude, des problèmes qu'elle pose.

- C H A P I T R E I -
=====

- G E N E R A L I T E S -

- A B R E V I A T I O N S -



<i>Ag</i>	:	antigène
<i>AC</i>	:	anticorps
<i>IgG</i>	:	immunoglobulines G
<i>IgM</i>	:	immunoglobulines M
<i>M.C.</i>	:	monocomposée (insuline)
<i>L/M</i>	:	litres/mole
<i>M/L</i>	:	moles/litre
$\mu\text{g/ml}$	:	microgrammes par millilitre
ng/ml	:	nanogrammes par millilitre
pM/ml	:	picomole par millilitre
<i>P.M.</i>	:	poids moléculaire.

I - HISTORIQUE DES ANTICORPS ANTIINSULINE :

En 1921, BANTING et BEST découvrent l'insuline. Extraite du pancréas par MAC LEOD, sa structure polypeptidique est définie par SANGER (1945-55).

Les premières préparations utilisées d'insuline cristallisée font apparaître chez l'homme des substances antiinsuline : en 1942, LOWELL les met en évidence par méthode biologique (61). Il rapporte, cinq ans plus tard, une observation d'insulinorésistance, liée à un antagoniste de l'insuline (62).

En 1956, l'étude *in vivo* du métabolisme de l'insuline marquée à l'iode 131, par YALOW et BERSON (11), permettait d'obtenir la confirmation de l'existence des anticorps antiinsuline

Leur observation précise, d'une part, la demi-vie de l'insuline radioactive, injectée par voie veineuse ; d'autre part, la migration de l'insuline marquée à l'électrophorèse sur papier, après son incubation avec un sérum de malade. Chez le sujet normal, l'insuline radioactive disparaît du plasma en 15 à 20 minutes. Lorsqu'un sérum de sujet normal, incubé avec de l'insuline marquée, est soumis à l'électrophorèse, l'insuline radioactive reste au point de dépôt. Par contre, chez le diabétique insulinodépendant, l'insuline marquée à l'iode 131 demeure 15 à 20 jours dans le plasma. Après incubation avec un sérum de diabétique traité à l'insuline, l'insuline marquée migre sur le papier dans la zone des β - γ globulines.

La preuve de l'existence des anticorps antiinsuline était faite. Cependant, on ne parvenait pas à expliquer comment l'insuline, petite molécule de poids moléculaire 6000, pouvait jouer le rôle d'antigène.

Dès 1964, les structures primaire (séquence d'acides aminés), secondaire et tertiaire sont précisées : les différences de structure primaire de l'insuline des espèces animales sont jugées responsables de l'apparition des anticorps antiinsuline. C'est pourquoi de nombreux essais d'immunisation sont pratiqués chez l'animal : le boeuf (80), le lapin (106), le cheval (82), le porc (65-70) et chez l'homme (66-71). Les deux procédés d'immunisation sont utilisés :

- . en système hétérologue : l'insuline injectée provient d'une espèce différente de celle des animaux étudiés,
- . en système homologue : l'insuline injectée et l'animal étudié sont de la même espèce animale.

L'immunisation, de type hétérologue ou homologue, fait apparaître des anticorps antiinsuline (70). Ainsi, l'hypothèse selon laquelle la différence de structure primaire serait directement responsable de l'élaboration d'anticorps se trouvait infirmée.

En 1968, STEINER filtre, sur gel Sephadex, une préparation d'insuline utilisée en thérapeutique (96). Il parvient à séparer l'insuline - poids moléculaire 6000- de contaminants protéiques d'origine pancréatique, de la pro-insuline, de peptides insulín-like. Cette insuline pure, débarrassée de ces "impuretés" suscite un grand intérêt à l'heure actuelle : appelée monocomposée, elle offrirait l'avantage d'être moins antigénique.

II - NOTION D'ANTICORPS :

On appelle anticorps, ou immunoglobuline, un ensemble de protéines synthétisées par l'organisme, en réponse à l'administration d'un antigène. La réponse primaire, rapide, fait apparaître des IgM. Secondairement, les anticorps sont surtout des IgG.

- IgM = polymère d'IgG, leur P.M. est de 900.000 à 1 million et leur constante de sédimentation de 19 Svedberg.
- IgG = de P.M. : 160.000, leur constante de sédimentation est de 7 Svedberg. Chaque molécule d'IgG est constituée de :
 - . 2 chaînes légères (L)
 - . 2 chaînes lourdes (H) reliées entre elles et avec les chaînes légères par 2 ponts disulfure .

Une chaîne légère et une chaîne lourde déterminent un site spécifique ou site anticorps, où vient se fixer l'antigène qui lui a donné naissance. (figure 1)

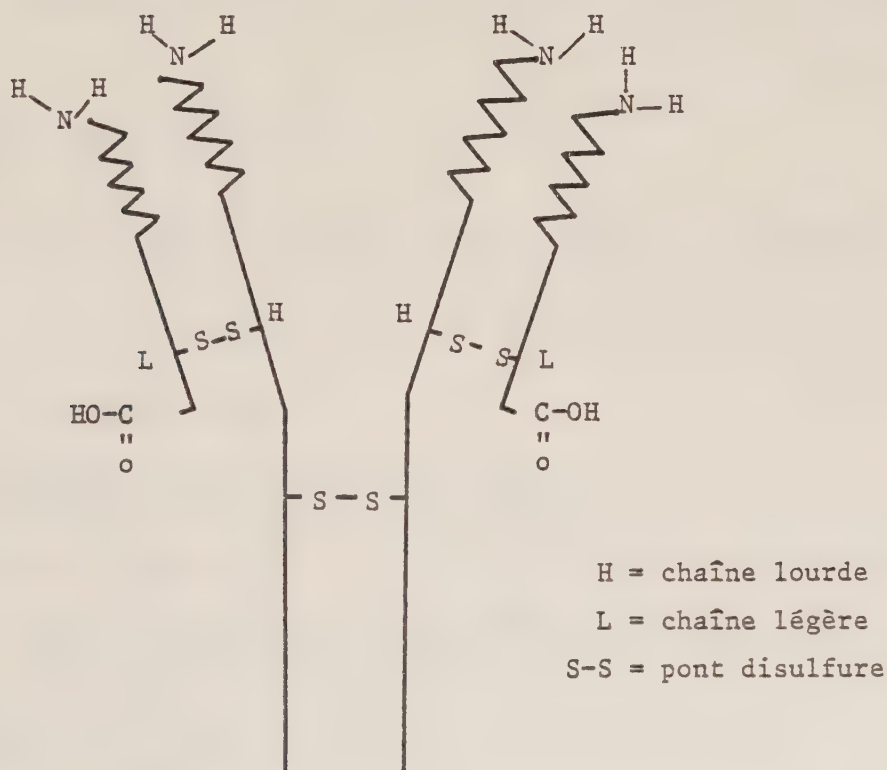


figure 1 : SCHEMA D'UNE IMMUNOGLOBULINE G

III - LA NATURE DES ANTICORPS ANTIINSULINE :

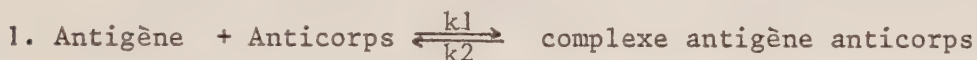
Dans le plasma, des sujets traités à l'insuline, l'insuline peut se fixer aux α_2 protéines mais un tel mode de liaison n'est pas de nature immunologique, puisque l'hormone radioactive ne se trouve pas déplacée par l'insuline froide (85). Au contraire, la liaison insuline-immunoglobulines est bien de nature immunologique.

D'autres arguments existent pour confirmer ce fait :

- a. Les protéines qui se lient à l'hormone sont précipitées par un sérum anti-immunoglobuline.
- b. KARAM étudie 40 sérums de diabétiques insulino-dépendants renfermant des anticorps anti-insuline (49). Il met en évidence la nature IgG de ces anticorps :
 - . dans 80 % des cas, ces IgG existent isolément,
 - . dans 20 % des cas, elles sont associées à des IgM-IgA.
- c. L'étude en ultracentrifugation (87) permet de définir la constante γS de ces globulines.
- d. Elles traversent le placenta et sont retrouvées dans les sangs du cordon et du nouveau-né de mère insulino-dépendante. Les anticorps anti-insuline maternels persistent quelques mois chez l'enfant avant de disparaître (48).
- e. La latence d'apparition de ces globulines est de l'ordre de 3 mois, et leur turn over de 25 jours proche de celui des IgG immunes.
- f. Lors de l'arrêt éventuel d'une insulinothérapie, ces gamma globulines G immunes disparaissent du sang circulant dans un délai de onze mois (87).

IV - LA REACTION ANTIGENE-ANTICORPS :

La réaction antigène-anticorps, réaction d'équilibre dynamique, obéit à la loi d'action de masse de GULDBERG et WAAGE. Elle s'écrit :



où k_1 représente la constante d'association
 k_2 la constante de dissociation du complexe.

A l'équilibre, nous avons :

- . (Ag) = concentration molaire de l'antigène libre
- . (AC) = concentration molaire des sites anticorps restés libres dans le milieu
- . $(AgAC)$ = concentration molaire des sites anticorps liés

et nous pouvons écrire :

$$2. K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{(Ag \ AC)}{(Ag) \cdot (AC)}$$

Si l'on appelle (ACo) la concentration molaire totale des sites anticorps :

$$3. \quad (ACo) = (AC) + (AgAC)$$

$$4. \text{ donc, } (AC) = (ACo) - (AgAC)$$

et l'équation 2. devient alors :

$$5. \quad K \left((ACo) - (AgAC) \right) = \frac{(AgAC)}{(Ag)}$$

Afin de permettre une écriture simplifiée de l'équation, l'habitude est prise de n'envisager, dans le complexe, que la forme liée de l'hormone et de remplacer (AgAC) par (B) ; la concentration de l'antigène libre (Ag) étant désignée par (F).

La relation 5. s'écrit alors :

$$6. \quad K (ACo - B) = \frac{B}{F}$$

Le rapport $\frac{B}{F}$ apparait comme une fonction linéaire de la concentration en hormone liée "B" : l'expression graphique $\frac{B}{F}$ f (B) est une droite :

- a. dont la pente égale K
- b. lorsque $\frac{B}{F}$ tend vers zéro, $B = (ACo)$: (ACo) est donné par la valeur du point d'intersection de la droite avec l'axe des abscisses.
- c. il est une autre manière d'obtenir la concentration (ACo). Lorsque la concentration en antigène est très faible et négligeable, devant le nombre de sites anticorps présents, la quantité d'antigène lié sera minime : c'est à dire, si B tend vers zéro, le rapport $\frac{B}{F}$ égale $K.(ACo)$: point d'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées.

Dans le cas contraire, la concentration d'anticorps rendue très inférieure à celle de l'antigène par un facteur "n" de dilution de l'anti-sérum, on peut écrire lorsque B tend vers zéro :

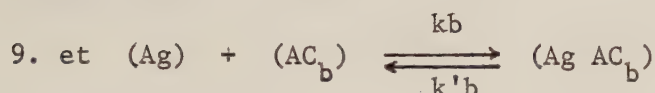
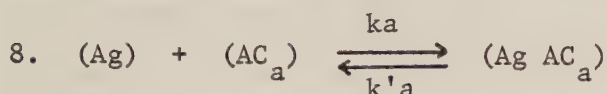
$$7. \text{ limite } \frac{B}{F} = \frac{K (Aco)}{n} \text{ et } \frac{B}{F} \text{ est alors directement proportionnel à } \frac{1}{n}$$

V - LES MODELES MATHEMATIQUES DE LA REACTION INSULINE-ANTICORPS ANTIINSULINE :

Le mérite revient à YALOW et BERSON (108) d'avoir envisagé différents modèles mathématiques,

- . soit insuline monovalente, deux ou plusieurs sites anticorps,
- . soit insuline divalente, un ou plusieurs sites anticorps.

Seul le premier modèle mathématique sera développé ici, car il est vérifié par les données expérimentales (108). Il considère l'insuline monovalente et deux sites anticorps (AC_a) et (AC_b). Pour chaque site anticorps, nous pouvons écrire :



se référant à l'équation 6. précédente, il est permis d'écrire :

$$10. \frac{B}{F} = K_a ((ACo_a) - (Ba)) + K_b ((ACo_b) - (Bb))$$

La concentration en hormone liée s'exprime par :

$$(B_a + B_b) = (Ag AC_a) + (Ag AC_b)$$

$K = K_a + K_b$ représente la constante d'équilibre dudit système.

Lorsque B tend vers zéro, $\frac{B}{F}$ tend vers $K_a ACo_a + K_b ACo_b$. L'expression graphique de la fonction $\frac{B}{F}$ en fonction de B n'est plus une droite, mais une courbe concave vers le haut :

a → dont les pentes représentent K_a et K_b ,

b → les valeurs (ACo_a) et (ACo_b) peuvent être obtenues par les valeurs de B aux points d'intersection avec l'axe des abscisses.

Les prolongements vers l'axe des ordonnées donnent les valeurs de $K_a (ACo_a)$ et $K_b (ACo_b)$.

Les constantes $K_a - K_b$, le nombre total de sites anticorps (ACo_a) et (ACo_b) peuvent être déterminés chez un diabétique traité par l'insuline de porc ou de boeuf. K_a et K_b représentent l'affinité des deux populations d'anticorps produits pour l'insuline.

Le deuxième modèle mathématique :

L'étude de YALOW et BERSON démontre, si l'on considérait l'insuline divalente, que $\frac{B}{F}$ serait une fonction du facteur de dilution "n" élevé à une certaine puissance = cela n'est jamais le cas en pratique, puisque $\frac{B}{F}$ diminue toujours en fonction de $\frac{1}{n}$.

En résumé, la monovalence de l'insuline est reconnue au même titre que l'existence de deux populations d'anticorps antiinsuline.

VI - METHODES DE DETECTION DES ANTICORPS ANTIHORMONE CIRCULANTS :

Après incubation du sérum avec l'hormone marquée, il faut séparer l'hormone marquée restée libre "Free" (F) de l'hormone fixée aux anticorps "Bound" (B). Lorsque le complexe antigène-anticorps est soluble, ce qui est le cas généralement, une telle séparation s'avère délicate : le nombre des méthodes proposées en est le reflet :

A. La migration dans un champ électrique diffère pour l'hormone restée libre et le complexe hormone anticorps.

1. La chromat électrophorèse, préconisée par YALOW et BERSON (11) demeure la méthode de référence. Son principe repose sur le fait que l'hormone libre reste adsorbée au point de dépôt sur le papier de cellulose, alors que le complexe Ag-AC migre avec les γ globulines sous l'influence du champ électrique et de l'évaporation du solvant. Elle consiste, après une heure d'incubation, à $+4^\circ$, en une électrophorèse sur papier Whatman 3MM pendant une heure à $+4^\circ$ et sous 450 Volts, dans une cuve non fermée. Une goutte de bleu de bromophénol permet de suivre le front de migration des protéines. Lorsqu'il atteint 8 à 10 cm, la bande de papier est séchée à 110° . Elle peut alors :

- . soit être découpée, en fragments de 0,5 cm, à partir du point de dépôt et l'activité de chacun des fragments est mesurée à l'aide d'un détecteur de photons γ ,
- . soit défiler sous un compteur sensible aux rayons γ : on obtient alors un radiochromatogramme.

La figure 2 permet de constater, chez le sujet normal (a), que l'hormone marquée demeure au point de dépôt (désigné par la flèche sur la figure). Par contre, le tracé obtenu à partir d'un sérum de diabétique insulino-dépendant (b) objective 2 pics :

- . au point de dépôt, la fraction restée libre du traceur ;
dans la zone des γ globulines

2. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été utilisée par SIRAKOV et DITZOV (95).

Le gel d'acrylamide (à 7% et à pH = 8,6) est placé en tubes calibrés. Une partie aliquote de l'incubation, déposée à la surface du gel, est soumise à un courant de 6mA pendant 90 minutes. Après coloration, le gel est alors découpé en bandes de 2 mm et la radioactivité de chaque fraction peut être déterminée.

B. L'immunoprécipitation, encore appelée système à double anticorps (42), repose sur la précipitation du complexe antigène-anticorps par un sérum anti γ globuline. Le précipité obtenu est séparé par centrifugation ou filtration. Il suffit alors de mesurer son activité.

Radio-électrophorégramme sur papier
 a serum humain normal
 b " de diabétique traité

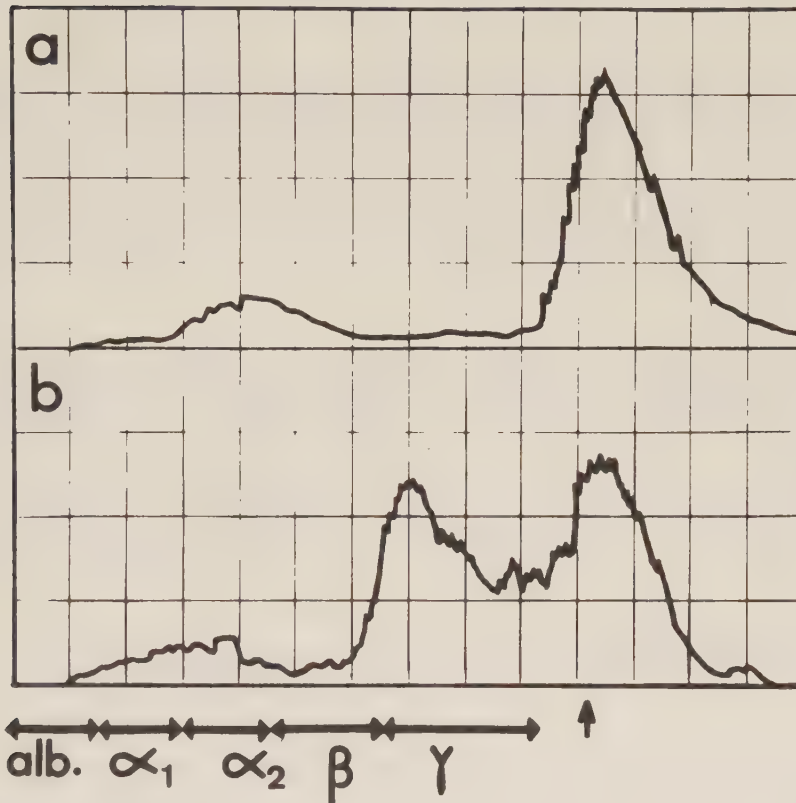


figure n° 2

- . L'insuline marquée reste au point de dépôt (flèche) chez le sujet normal.
- . Elle migre avec les γ globulines chez le diabétique insulino-dépendant.
- . A noter l'interférence non spécifique des α_2 globulines liées à l'insuline marquée.

C. Précipitation de la fraction B :

1. Par l'alcool à 80 %. Certains auteurs (43-107) proposent, après incubation, de précipiter la fraction liée aux anticorps par addition d'alcool au milieu réactionnel. La fraction libre de l'hormone reste dans le surnageant. Après lavage, au sérum salé isotonique, la radioactivité du culot est déterminée.
2. Par le sulfate d'ammonium à demi-saturé : la fraction liée B précipite et peut ainsi être séparée de l'hormone libre.

D. L'adsorption de la fraction libre sur un substrat solide correspond au "négatif" de la méthode précédente. L'hormone restée libre s'adsorbe à une structure solide. Après centrifugation, elle se trouve dans le culot, au contraire du complexe antigène marqué anticorps qui reste dans le surnageant. Le charbon de bois, entouré de dextran, tient lieu de substrat solide pour les auteurs polonais (78) qui préconisent ce procédé de séparation.

E. Les deux fractions liée et libre peuvent être filtrées sur Sephadex G.200. Cette technique des immunosorbents utilise la différence de taille entre l'hormone libre et le complexe antigène-anticorps.

Cette méthode, utilisée par ZIEGLER (112) nécessite une élution et le fractionnement en volumes de 3 ml environ, dont la radioactivité est déterminée au compteur γ .

F. Deux méthodes classiques de l'immunologie peuvent encore être pratiquées :

1. L'immunodiffusion selon Ouchterlony :

Deux puits sont creusés sur une plaque d'agarose : dans l'un, une partie aliquote du mélange d'incubation, dans l'autre une antiglobuline humaine correspondant à l'anticorps à tester. La rencontre de l'anticorps lié à l'hormone et de l'antiglobuline humaine se révèle par la formation d'un arc de précipitation, radioactif, qui impressionne une émulsion photographique.

2. L'immunoélectrophorèse se décompose en deux temps. Tout d'abord, électrophorèse du milieu d'incubation sur gel d'agar à 1 %, pendant une heure sous une tension de 220 Volts. Puis une gouttière creusée dans la gélose contiendra un antisérum humain d'origine animale poly ou mono valent. Une diffusion pendant 24 heures permet la visualisation d'arcs de précipitation. Mais, seul l'arc qui correspond à la fraction sérique de potentialité anticorps sera radioactif.

- C H A P I T R E I I -

- M E T H O D O L O G I E -

I - L'ELECTROIMMUNODIFFUSION

selon LAURELL (58), a été adaptée pour les anticorps antiinsuline par CHRISTIANSEN (18). Ses modalités sont détaillées ici, car elle a été utilisée au cours de ce travail.

a. PRINCIPE :

Une protéine sérique peut précipiter, lors d'une électrophorèse en agarose, si le gel contient l'anticorps dirigé contre elle. A pH = 8,6, les immunoglobulines G se déplacent à la fois vers l'anode et la cathode. La rencontre avec l'antiimmunoglobuline G humaine, contenue dans l'agarose, fait apparaître un "cône" ou un "cigare" de précipitation, dont la hauteur est directement proportionnelle à la concentration en IgG. La radioactivité du cigare, qui représente l'hormone liée "B", est évaluée au compteur γ .

b. MATERIEL :

. Tampon

- . stock : Barbitol 10,35 g.
Barbitol sodé 65,7 g
Eau distillée qsp : 5 litres
pH : 8,6
Force ionique : 0,07

- . pour les bacs d'électrophorèse, le tampon stock est utilisé dilué au 1/2 dans l'eau distillée.
- . pour l'incubation et les plaques d'agarose, le tampon stock est dilué au 1/3 dans l'eau distillée.

. Agarose : Industrie Biologique Française (ref. A.37)

Une solution dans le tampon : 1 g d'agarose pour 100 ml nécessite, pour sa dissolution, une température de 90°C. Des tubes contenant 13 ml d'agarose peuvent être conservés à + 4°C

. Traceur : Novo Institute - Copenhagen.

L'insuline de boeuf ou de porc, marquée à l'iode 125, contient 20 à 25 m U d'hormone par ml, possède une activité spécifique de 15 à 25 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

Dès réception de la préparation lyophilisée, l'addition d'eau distillée permet d'obtenir 1 ml de solution de travail fractionnée en parties aliquotes, placées à -18°C. Cette solution contient 0,85 μg d'insuline/ml.

. Antisérum continu dans le gel : Sebïa (réf.10090)

renferme des anti IgG humaines, chaîne H, préparées chez le lapin.

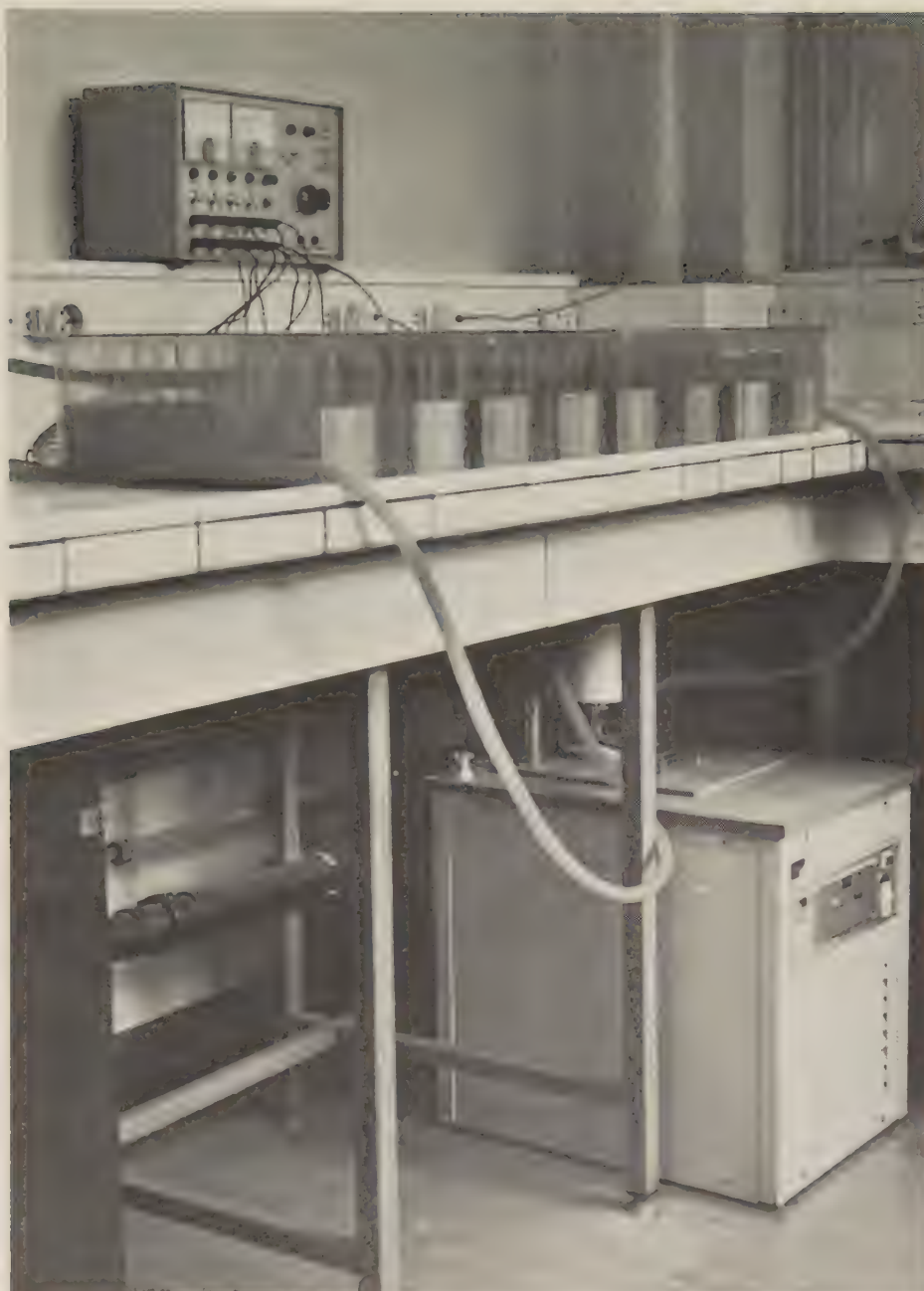


Photo 1

L'APPAREIL D'ELECTROPHORESE

Il comprend un générateur de courant,
les cuves, un réfrigérant à circuit fermé.

. L'appareil d'électrophorèse : Hoechst Böehringer (photo 1)

Il comprend :

- un générateur, muni d'un alternateur de courant, permet le branchement de 4 cuves en parallèle.
- la cuve se compose de 2 bacs, pouvant contenir chacun 900 ml de tampon et qui supportent l'anode et cathode.
- un système de réfrigération, en circuit fermé, permet de réaliser la migration à $+ 4^{\circ}\text{C}$.
- plaques de verre planes 100 x 100 mm x 1,5 mm
- table à niveau
- matrice de perforation dont les trous sont espacés de 0,5 cm
- emporte-pièce de 2,5 mm - Lames 2 x 15 cm
- pipettes à double constriction = 5 et 10 μl (réf. ME Petersen)
- boyau de dialyse 4 cm de large
- carrés de gaze 10 x 10 cm
- passeur d'échantillons relié à un détecteur de rayons γ .

. Le prélèvement sanguin :

est effectué à jeun, et avant l'injection d'insuline chez le diabétique, sur tube sec. Une conservation à $+ 4^{\circ}\text{C}$ est tolérée 2 à 3 heures. Le sérum, séparé par centrifugation, est congelé immédiatement.

c. METHODE :

Elle se déroule en trois jours :

- Premier jour : L'incubation

Dans un tube on introduit des volumes égaux (10 μl par exemple) de sérum du malade, de traceur, de tampon barbitol au tiers. La température de 4°C et le temps de 18 à 24 heures sont nécessaires. Pour chaque série, l'incubation d'un sérum normal est effectué, afin de déterminer l'interférence due à la liaison non spécifique des protéines d'un sérum normal avec le traceur et l'agarose.

- Deuxième jour :

A. Préparation de la plaque d'agarose :

- . Un tube contenant 13 ml d'agarose à 1 % est liquéfié dans un bain marie bouillant. Il doit être thermostaté pendant 10 minutes au moins entre 55°C et 60°C . Cette liquéfaction thermostatée de l'agarose est importante : en dessous de 50°C , l'agarose se solidifierait et une température supérieure à 65°C endommagerait l'antisérum (anti IgG humaines) introduit dans le gel.
- . Deux millilitres d'anti IgG humaines γ sont incorporés : les 15 ml, bien mélangés, ne doivent pas contenir de bulle. On verse la solution ainsi obtenue sur la plaque de verre préalablement chauffée à 50°C , posée sur la table à niveau.

- . Après 10 minutes à la température du laboratoire, le gel de 1,5 mm d'épaisseur, sans le moindre défaut de surface, apparaît gris.
- . 12 puits de 2,5 mm de diamètre sont alors percés dans l'agarose, sur une ligne à 3 cm du bord cathodique. Le puits proprement dit doit être strictement circulaire, sans fissure, ses parois seront régulières sinon des communications par diffusion pourraient se faire entre les précipités.

B. Les incubations, mixées, sont utilisables :

- On dépose alors dans deux puits le même milieu d'incubation sous un volume de 5 μ l. Ainsi une plaque permet l'étude de 6 sérums.
 - 5 μ l sont également déposés dans un tube de 2 ml d'eau distillée : il s'agit de la radioactivité totale, introduite dans chaque puits : T.
- C. Sur la plaque d'agarose, côté anodique, sur 2 cm, est déposée une membrane de dialyse qui évite, d'une part, la distorsion des précipités, et d'autre part, la contamination des bacs de tampon par les protéines du sérum.
- D. La plaque, déposée sur le support de circulation d'eau réfrigérée, est reliée aux deux bacs par deux carrés de gaze imbibée de tampon déposés à 2 cm de chaque bord.

Pour parfaire le contact, une bande d'agarose 1 % de 2 cm de large est apposée sur la gaze. (photo 2)

Chaque cuve peut contenir 2 plaques. Un système d'électrodes séparées permet la mesure du courant = 2 volts/cm au sein du gel, à chaque extrémité. L'intensité par cuve varie entre 10 et 16 milliampères.

- Troisième jour :

Après 18 à 24 heures de migration, des cigares de précipitation apparaissent. Ils comprennent, dans le cas de sérums contenant des anticorps anti-insuline, l'insuline marquée liée aux IgG, elles-mêmes piégées par les anti IgG du gel. L'hormone restée libre, elle, a migré vers l'anode.

La plaque d'agarose, retirée par son côté cathodique, est séchée pendant 1 à 2 minutes par un carré de papier filtre.

Elle peut, dès lors être photographiée (photo 3) ou bien on peut mesurer la radioactivité de chaque précipité. A l'aide d'une première lame, les aires d'agarose non concernées par les cigares de précipitation sont écartées. Une seconde lame permet de découper les cigares en les séparant. Un support de film radiologique (large de 7 mm, long de 2 cm) suffit pour soulever chaque précipité et le déposer dans un tube de 2ml d'eau distillée. Il s'agit de l'activité d'hormone liée aux anticorps : B.

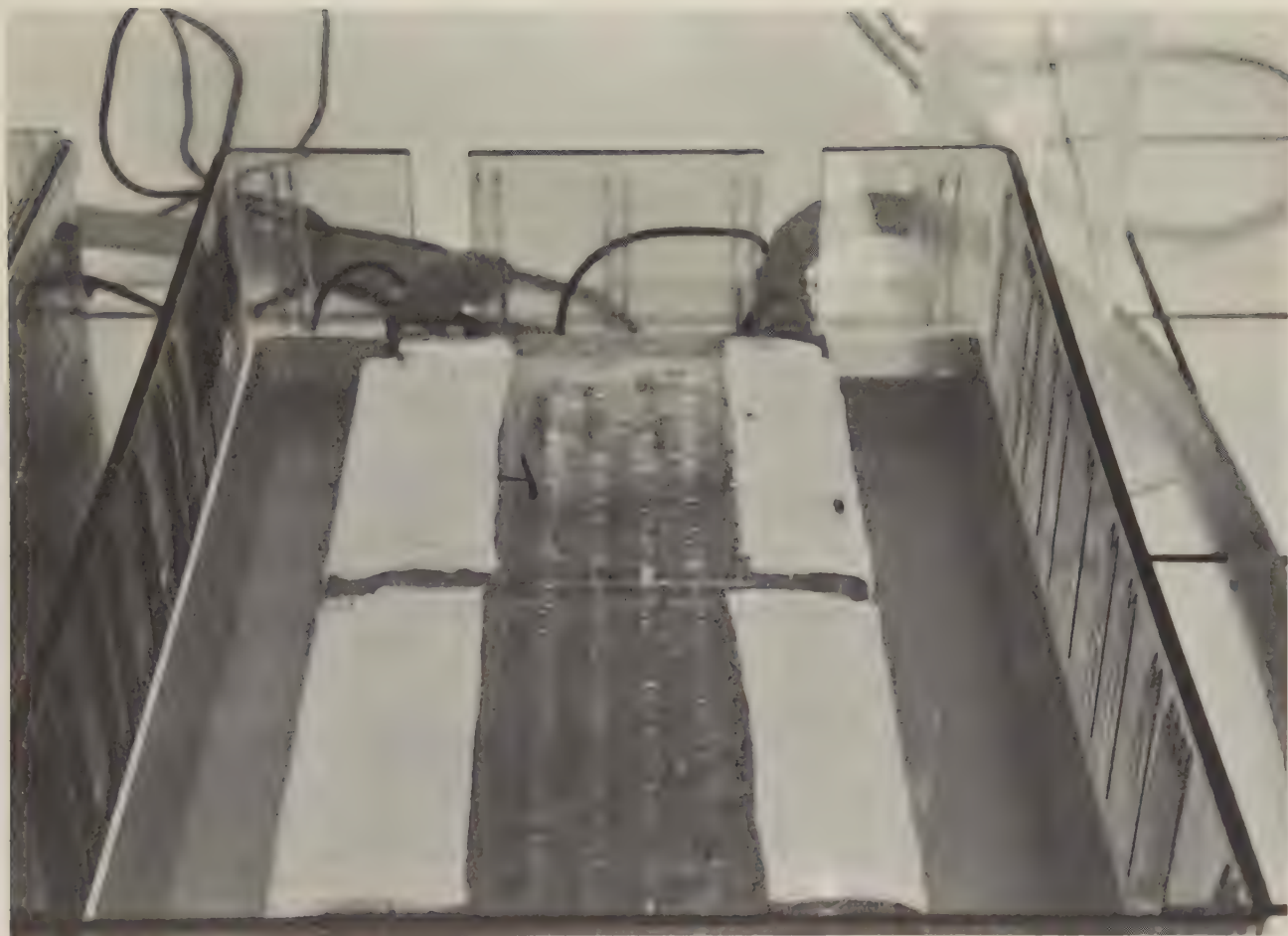


Photo 2

- LA CUVE D'ELECTROPHORESE

reliée au générateur, elle peut contenir deux plaques :
Les ponts (gaze et agarose) permettent le passage du courant.



Photo 3

LES "CONES" DE PRECIPITATION
APRES L'ELECTROIMMUNODIFFUSION

II - EXPRESSION DES RESULTATS :

Il existe deux façons d'exprimer le titre d'anticorps d'un sérum :

a. La première :

Le titre est assimilé à la dilution du sérum qui fixe 50 % du traceur. En pratique, le sérum à étudier est dilué, selon une progression géométrique, dans un sérum de sujet normal, ne contenant pas d'anticorps. La représentation graphique de B/T . ($\frac{\text{hormone liée}}{\text{hormone totale}}$) en fonction de $\frac{1}{n}$ permet pour $\frac{B}{T} = 50 \%$ de connaître $1/n$ donc "n".

b. La seconde :

Le titre du sérum est assimilé au rapport $\frac{B}{T}$ exprimé en pourcentage :

$$\frac{\text{activité de l'hormone liée}}{\text{activité totale introduite lors de l'incubation}} \times 100$$

Il s'agit du pourcentage d'hormone marquée liée aux immunoglobulines G du sérum. Dans ce travail, les taux d'anticorps antiinsuline sont tous exprimés de cette manière.

III - CARACTERES DE LA METHODE DE CHRISTIANSEN :

Comme tout dosage utilisé en radioimmunologie, cette méthode devait être testée du point de vue :

- a. sensibilité
- b. reproductibilité
- c. spécificité.

a. SENSIBILITE OU SEUIL DE DETECTION :

- Pour YALOW et BERSON, la sensibilité se définit comme la pente à l'origine de la courbe d'étalonnage, dans le cas d'un dosage d'hormone : cela n'était pas réalisable pour le cas des anticorps antiinsuline.
- Pour EKINS (27bis), la sensibilité représente la plus petite quantité d'hormone décelable.
- Nous pouvons parler de seuil de détection, de "bruit de fond" de la méthode.
- En pratique, nous avons évalué le rapport $\frac{B}{T}$ pour $n = 9$ sérums normaux.

- Nous avons calculé la moyenne $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$.

$$\text{l'écart type} = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

avant de nous référer au procédé mathématique préconisé par HAHN (41) qui exprime la sensibilité S.

$$S = \bar{x} + \sigma \cdot r_{(n.k.\gamma.)}$$

$\bar{x}$ est la moyenne

σ l'écart type

r le coefficient donné par la table de HAHN, tient compte de 3 paramètres :

- . n : nombre de sérums étudiés (= 9)
- . k : représente le nombre de fois que sera effectué le dosage pour un sérum à étudier (k = 1)
- . γ : évalue à 99 % les chances pour que la valeur d'un futur dosage reste inférieure à la limite de détection.

Le tableau (1) ci-dessous rapporte les rapports $\frac{B}{T}$ de ces 9 sujets :

Sujet normal	AC % (B/T)
1	0,03 %
2	0,05 %
3	0,06 %
4	0,06 %
5	0,04 %
6	0,10 %
7	0,15 %
8	0,08 %
9	0,12 %

Tableau 1 : Seuil de détection de la méthode, déterminé pour 9 sujets normaux.

La moyenne $\bar{x}$ égale 0,076 % et l'écart type = 0,04

$$S = 0,076 + (0,04 \times 3,05) = 0,1980 \approx \underline{0,2 \%}$$

Donc, au delà de 0,2 % de fixation, nous pouvons affirmer la présence d'anticorps antiinsuline.

Date AC	Sérum 1	2.	3-	4-	5-	6.	7.	8-	9-	10-
	28.11. 1975	28.11. 1975	9.12. 1975	9.12. 1975	10.12. 1975	10.12. 1975	19.12. 1975	18.12. 1975	18.12. 1975	19.12. 1975
1	0	0	0,08	7,6	3,9	14,5	18,6	18,3	23,3	36,5
2	0	0	0,04	7,7	8,1	15	17,3	18,4	26	40
3	0	0	0,1	7,8	8,5	17,3	17,4	19,6	25,6	41,7
4	0	0	0	8,2	7,2	17,5	20	19,8	27,2	40,9
5	0	0	0,06	7,8	7,8	21	20	20	19,7	39,7
6	0	0	0,1	7,9	8,1	20,5	22,8	25,7	25,8	40,8
7	0	0	0,08	7,4	9,2	19,6	19,2	22,4	26,5	37,7
8	0	0	0,02	7,1	12,7	21,7	15,8	26,4	24,2	38,5
9	0	0	0,02	7,3	9,2	19,2	18,8	28,5	27,5	39,1
10	0	0	0,06	7	11,5	17	17,2	22,1	27,3	38
moyenne $\bar{x}$	0	0	0,06%	7,6%	9,2%	18,3%	18,7%	22,1%	25,3%	39,2%
Ecart type σ	0	0	0,0350	0,3771	1,7288	2,4680	1,9655	3,5985	2,3858	1,5773
Coefficient de varia- tion analy- tique $\sigma/\bar{x}$	0	0	0,5834	0,0497	0,1880	0,1349	0,1051	0,1629	0,0943	0,0403

Tableau n° 2 : ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE INTRASISTEME

Le coefficient de variation analytique oscille entre 4 % et 18,8 % (la valeur élevée 58,3 % est relative au taux d'anticorps très faible = 0,06 %).

b. REPRODUCTIBILITE :

Un système est qualifié reproductible si, lors de plusieurs dosages réalisés sur un même échantillon, les valeurs obtenues sont très voisines sinon identiques. Avec VALLERON (103), il nous faut définir :

- La reproductibilité intrasystème : le même échantillon est dosé plusieurs fois dans une même expérience.
- La reproductibilité intersystème : le même échantillon est dosé plusieurs fois dans le temps.

1. La reproductibilité intrasystème :

Toutes les conditions expérimentales sont rigoureusement identiques (manipulateur, nature de l'hormone marquée, tampon, compteur γ).

En pratique, nous avons dosé dix fois le même sérum. Dix sérums ont pu être étudiés : leur titre ($\frac{B}{T}$) variant de 0 à 39,2 %. Successivement pour chacun d'entre eux, nous avons calculé :

- la moyenne $\bar{x}$
- l'écart type $\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$
- le coefficient de variation analytique $C.V. = \frac{\sigma}{\bar{x}}$

Dans les mêmes conditions de dosage, le coefficient de variation oscille entre 4 et 18,8 %. Le tableau n° 2 rapporte ces résultats.

2. La reproductibilité intersystème :

Dans ce cas, le manipulateur, le lot d'hormone marquée, le compteur, ne sont plus rigoureusement identiques dans le temps.

En pratique, nous avons testé 12 sérums de titre variant entre 0 et 40,5 % et cela quatorze fois entre le 7 juillet 1975 et le 20 novembre 1975.

La même démarche statistique nous permet de dire que le coefficient de variation analytique est compris entre 12,2 et 29,2 %.(tableau 3)

Nous avons tracé les courbes qui représentent le coefficient de variation C.V. en fonction de la moyenne du taux d'anticorps, pour les reproductibilités intra et intersystème (figure 3).

Les deux courbes se coupent. Le coefficient de variation est plus élevé pour les taux d'anticorps bas de 0 à 10 %. Par contre, pour les autres valeurs de $\bar{x}$, il se situe généralement entre 10 et 16 %.

Pour la moyenne anticorps la plus haute (≈ 40 %) alors que la reproductibilité intrasystème est fidèle (C.V. = 4 %), la reproductibilité intersystème montre un coefficient de variation de 15 %.

En conclusion : Le système de dosage possède une bonne reproductibilité.

Date de dosage	sérum 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
7. 7.75	0	0	1,1	3,1	10,5	9,7	17,8	17,9	21	22,3	24,9	40
22. 7.75	0	0	1,1	4,6	10,8	13,1	14,3	21,6	26	25,6	32,1	38,5
23. 7.75	0	0	1,6	4,6	12,6	13,8	19,5	22,5	29	36,1	47,3	32,5
18. 8.75	0	0	0,9	3,9	7,2	15,3	20,4	23,1	23,6	30,1	35,5	36,2
8. 9.75	0	0	1	4	7	15	23	21	25	30	29	41
23. 9.75	0	0	1	4	15	15	25	21	32	37	35	51
29. 9.75	0	0	0,7	4,7	6,3	12	20,3	15,8	21,7	27,7	28	33,9
1.10.75	0	0	0,7	4,2	10,9	14,8	14,7	16,8	29,7	31,5	37,2	35
6.10.75	0	0	1,5	4,6	9,9	15	20,3	21	26,5	37,6	34,6	53,7
7.10.75	0	0	1,3	4,3	8,2	15	19,2	23	29,4	32,9	34,3	42,6
13.10.75	0	0	0,9	4,4	9	15	15	20,9	21,5	31,7	32,6	32,4
12.11.75	0	0	1,1	4,8	13,7	16,9	21,4	24,6	29,2	36,5	36	45,7
17.11.75	0	0	1,4	5,2	8	15,5	18,6	24	32,3	35,4	32,2	41,4
20.11.75	0	0	1,4	6	15,8	12,7	22,5	24,7	32,2	27,1	34,5	48,8
moyenne $\bar{x}$	0	0	1,1%	4,4%	10,3%	14,2%	19,4%	21,3%	27,1%	31,5%	33,8%	40,5%
Ecart type σ	0	0	0,2842	0,6725	3,0114	1,8073	3,1776	2,6066	3,8163	4,7092	5,1675	6,1422
Coeffi- cient de variation analytique $\sigma/\bar{x}$	0	0	0,2584	0,1529	0,2924	0,1273	0,1638	0,1224	0,1409	0,1495	0,1529	0,1517

Tableau n° 3 : ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE INTERSYSTEME

Le coefficient de variation analytique est compris entre 12,2 % et 29,2 %.

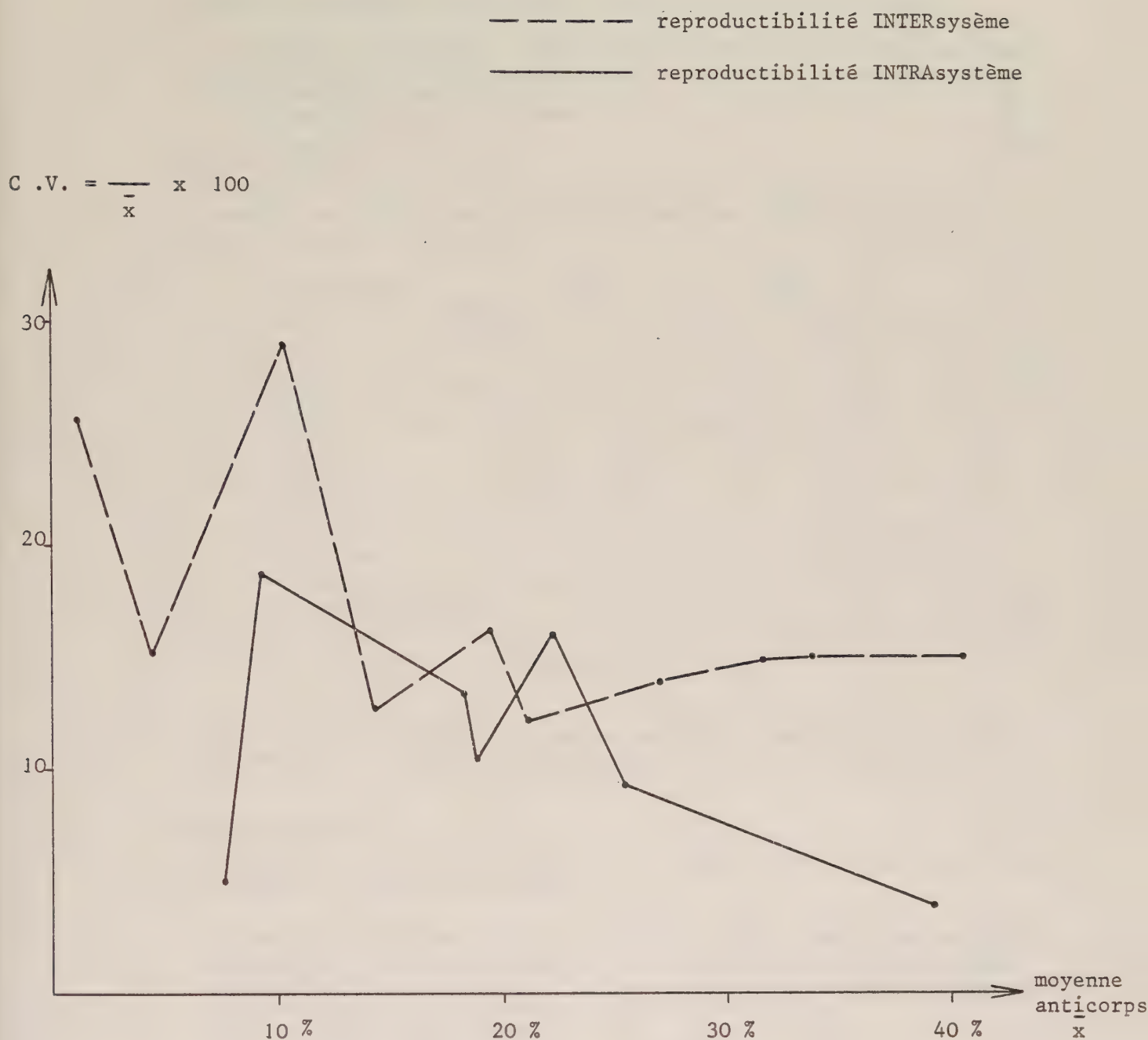


figure 3 : Etude du coefficient de variation analytique en fonction de la moyenne.

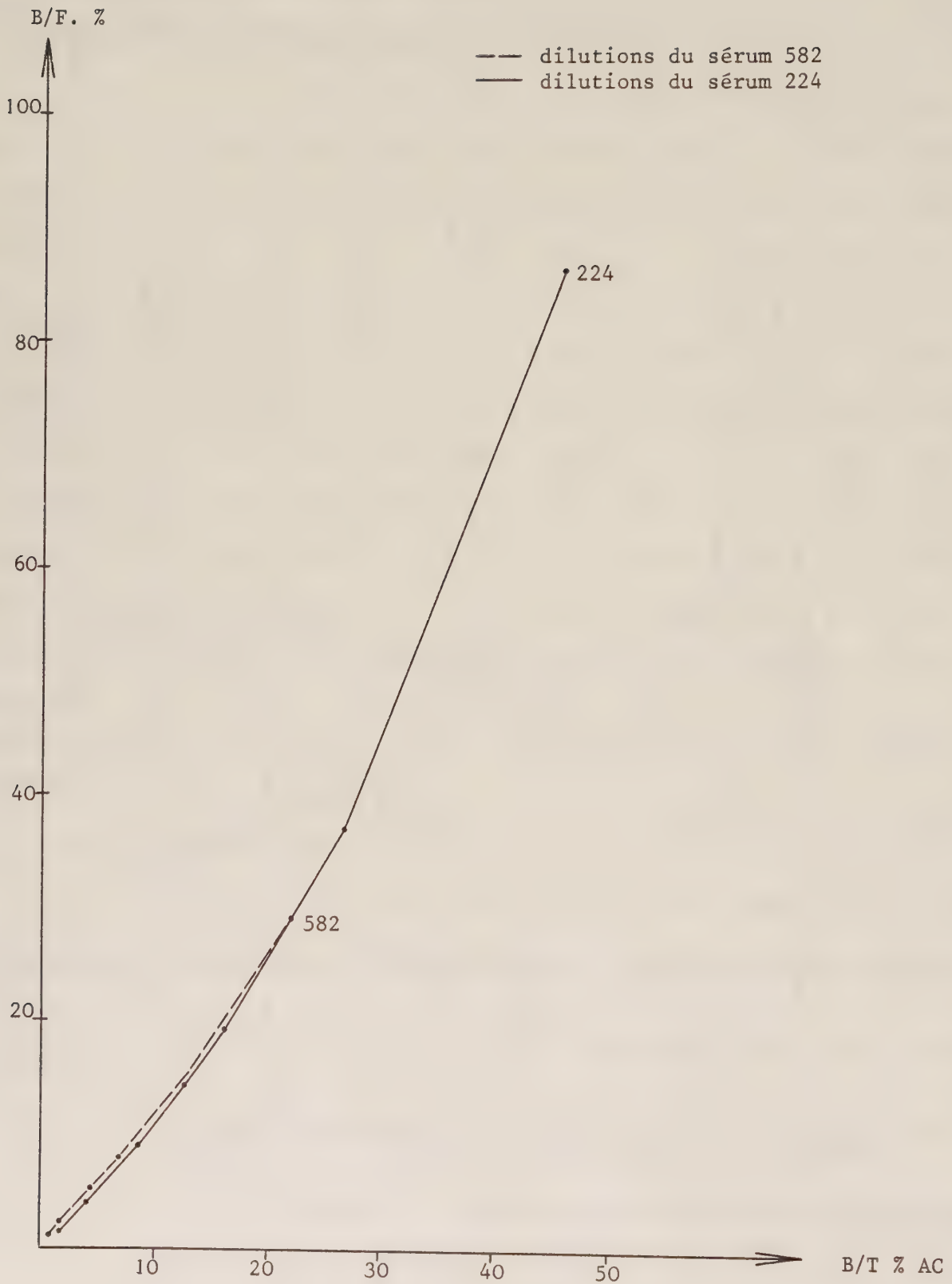


figure 4 : Réaction à antigène constant et anticorps variable.

$B/F \propto (B/T)$

La droite obtenue démontre le caractère monovalent de l'insuline.

3. Etude de la dilution d'un sérum d'activité anticorps élevée :

On procède aux dosages d'anticorps d'un sérum de diabétique : pur et dilué dans un sérum de sujet normal, selon une progression géométrique.

Premier exemple :

- a. Lorsque le taux anticorps du sérum pur est inférieur à 50 %, on observe une très bonne concordance des résultats (tableau 4).

<i>Dilutions</i>	<i>Sérum</i> <i>n° 582</i> $\frac{B}{T}$ %	<i>Sérum</i> <i>n° 224</i> $\frac{B}{T}$ %
Sérum pur	21,9 %	45,9 %
au-demi	12,2 %	26,7 %
au quart	6,9 %	15,9 %
au huitième	4,5 %	8,4 %
au seizième	1,7 %	4,1 %
au trente-deuxième	1,1 %	1,7 %

Tableau n° 4

- b. La droite $\frac{B}{F}$ obtenue en fonction du titre d'anticorps $\frac{B}{T}$ permet de préciser le caractère monovalent de l'insuline (figure 4).

Deuxième exemple :

Lorsque le rapport $\frac{B}{T}$ excède 50 %, l'anticorps se trouve en excès par rapport à l'insuline marquée.

- a. La quantité d'hormone marquée fixée par l'anticorps reste constante jusqu'à une certaine dilution. Ce qui explique que les dilutions successives d'un tel sérum n'influencent pas le rapport $\frac{B}{T}$. (tableau 5)

<i>Dilution sérum n° 661</i>	$\frac{B}{T}$ %
pur - non dilué	70,9 %
au demi	72,5 %
au quart	69,4 %
au huitième	61,8 %
au seizième	58,4 %
au trente-deuxième	38 %
au soixante-quatrième	21,7 %
au cent vingt-huitième	10,2 %

Tableau n° 5

B/F %

$$\cdot \frac{B}{F} \text{ f } \frac{B}{T}$$

- en présence d'un excès d'anticorps (B/T 38 %) et d'une quantité constante d'antigène.

L'anticorps sature les sites antigéniques de l'insuline.

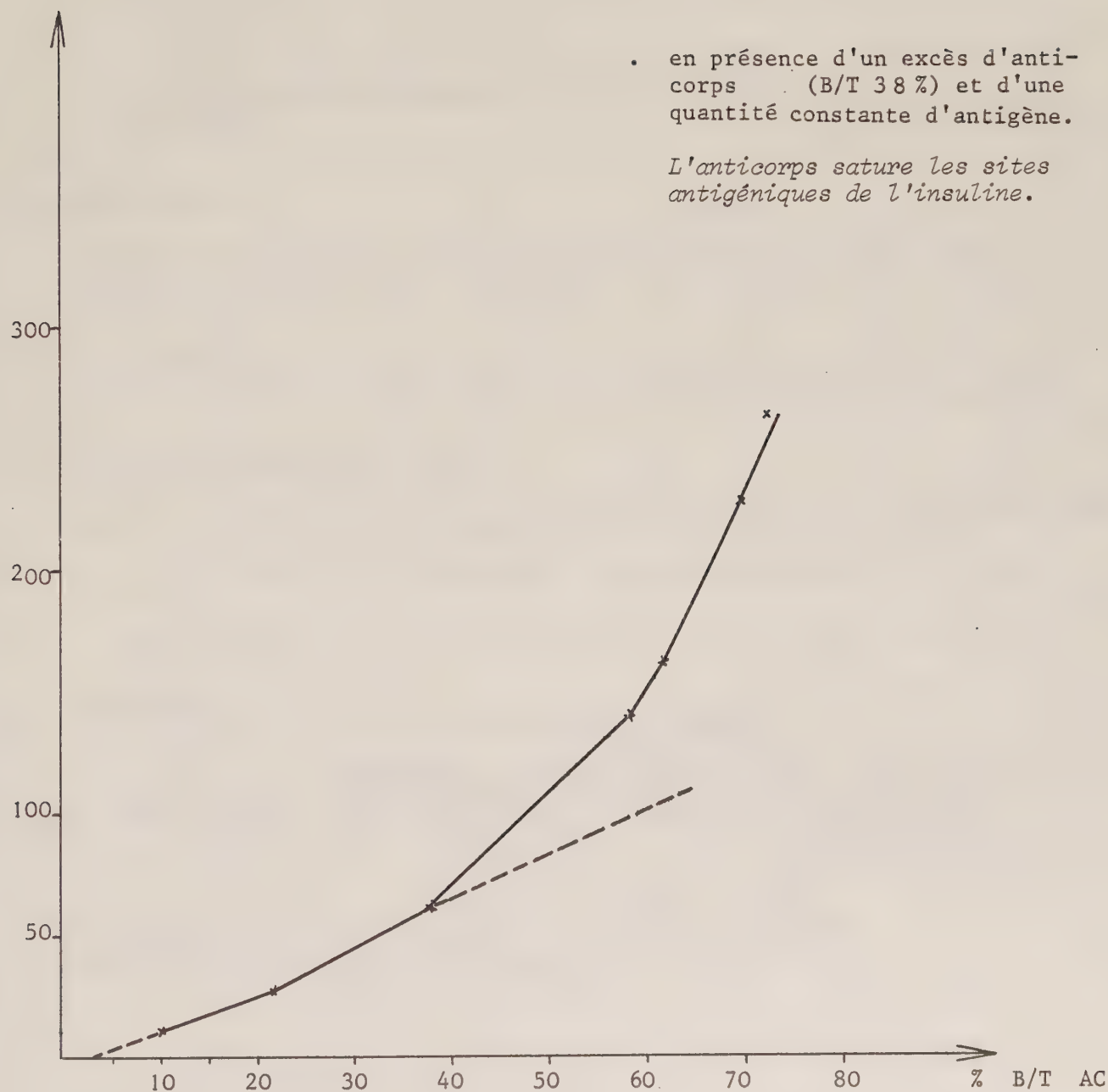


figure 5 : sérum n° 661

B/T = AC %

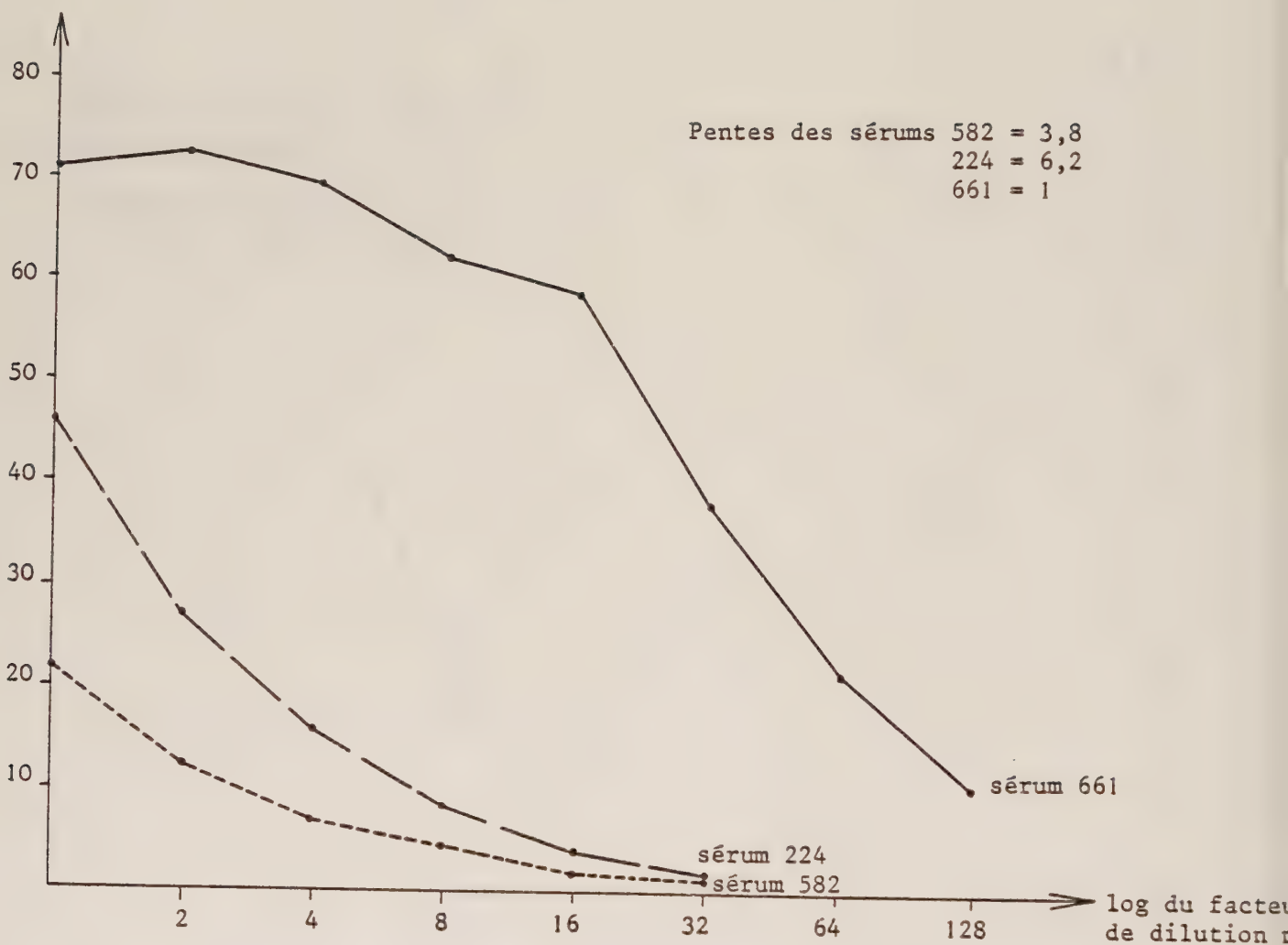


figure 6 : Réaction à antigène constant et anticorps variable .
B/T fonction du log du facteur de dilution.

Le résultat d'anticorps est rendu pour la dilution X, suivie de la dilution $\frac{X}{2}$ pour laquelle le résultat concorde : ici 38 % au $\frac{1}{32}$ car au $\frac{1}{64e}$ on a obtenu 21,7 %.

- b. La droite qui représente $\frac{B}{F}$ en fonction de $\frac{B}{T}$ s'infléchit vers le haut, dès la valeur $\frac{B}{T} = 38 \%$ (figure 5).

Nous avons porté la valeur $\frac{B}{T}$ en fonction du log du facteur de dilution (figure 6) : pour les titres d'anticorps inférieurs à 50 % la décroissance est géométrique.

Au contraire, pour un taux d'anticorps élevé, supérieur à 50 %, la courbe est en plateau. Il s'agit là d'un facteur de limitation de la méthode.

c. SPECIFICITE :

On dit qu'un système immunologique est spécifique lorsque le site anticorps et le déterminant antigénique sont complémentaires. Il nous faut distinguer :

- . L'interférence non spécifique : elle se rapporte à la méthode utilisée.
- . L'interférence spécifique du système insuline-anticorps antiinsuline.

1. L'interférence non spécifique :

est due à une liaison de l'hormone marquée, de type non immunologique, avec les substances contenues dans le milieu d'incubation.

- . Il peut s'agir d'une liaison de l'insuline marquée aux $\alpha 2$ globulines.
- . Nous étudions l'influence du taux d'IgG du sérum sur le résultat du titre d'anticorps.

a. Liaison de l'insuline marquée aux $\alpha 2$ globulines :

La méthode tient compte de cette interférence: dans chaque série de dosage, on incube un sérum de sujet normal, dépourvu d'anticorps antiinsuline. Après électrophorèse, l'activité du complexe IgG anti IgG, exprimée en coups par minute, est toujours inférieure ou égale à une fois et demi le bruit de fond du compteur. Cette valeur B est retranchée de la valeur Bx du sérum à tester :

exemple : . Bruit de fond = 42 impulsions/mn
 . B témoin = 60 cp/mn
 . Bx malade = 1900 cp/mn
 . Activité totale = 21.000 cp/mn

$$\frac{B}{T} \% = \frac{Bx - B.}{AT - b.fond} \times 100$$

$$\frac{B}{T} = \frac{1900 - 60}{21000 - 42} = \frac{1840}{20958} \times 100 = 8,8 \%$$

<i>Quantité IgG rajoutée</i>	<i>Quantité IgG totale</i>	<i>AC Sérum 141</i>	<i>Quantité totale IgG</i>	<i>AC Sérum 331</i>	<i>Quantité totale IgG</i>	<i>AC Sérum 717</i>	<i>Quantité totale IgG</i>	<i>AC Sérum 431</i>	<i>Quantité totale IgG</i>	<i>AC Sérum 396</i>
0	2170	38,4%	690	18,6%	1430	10,8%	720	14 %	2030	3 %
100 mg%	2270	29,9	790	17,1	1530	11,7	820	10,3	2130	2,9
200 mg%	2370	34,2	890	20,7	1630	13,6	920	13,6	2230	2,2
250 mg%	2470	33,4	940	21,4	1680	13,4	970	13,2	2280	2,5
400 mg%	2570	33,7	1090	18,8	1830	12,7	1120	12,5	2430	2
500 mg%	2670	33,9	1190	20	1930	12,3	1220	14,1	2530	2,7
800 mg%	2970	37,2	1490	25,1	2230	12,4	1520	13,9	2830	2,4
1000 mg%	3170	34,7	1690	18,6	2430	12,9	1720	15,6	3030	2,3
1600 mg%	3770	29,8	2290	20,5	3030	12,7	2320	14,2	3630	2
2100 mg%	4270	34,4	2790	17,7	3530	11,8	2820	14,8	4130	1,9
3200 mg%	5370	38	3890	17,3	4630	12,7	3920	15,7	5230	2
6400 mg%	8570	35,8	7090	16,8	7830	11,5	7120	12	8430	2,3

Tableau n° 6 :

*La surcharge en immunoglobulines G humaines de 5 sérums
n'influence pas le taux d'anticorps antiinsuline.*

b. Influence du taux d'IgG du sérum :

- Enfin, la méthode de dosage utilisée mettant en évidence la liaison insuline marquée IgG du sérum, il était intéressant de savoir si le taux d'anticorps antiinsuline était ou non dépendant de la concentration d'immunoglobulines G.

- Nous avons procédé à deux séries de tests :

- le premier se rapproche de l'interférence non spécifique. Nous avons introduit, dans le milieu d'incubation, des concentrations croissantes d'immunoglobulines G humaines de sujets non immuns, et déterminé le taux d'anticorps du sérum. 5 sérums de titre différent ont été incubés. Le rapport $\frac{B}{T}$ pour chacun d'eux n'a pas varié (tableau 6) et le coefficient de corrélation entre le taux d'immunoglobulines G exprimés en mg % et le taux d'antiinsuline en pourcentage, confirme bien qu'il n'existe aucune liaison ($r = -0,24$) entre la surcharge en immunoglobulines G du milieu d'incubation et l'activité insuline marquée - IgG du sérum. Ce résultat était attendu, puisque les immunoglobulines G du malade possèdent le caractère antiinsuline, contrairement à celles introduites dans le milieu.
- le second a consisté à rechercher s'il existe une relation entre la concentration sérique des immunoglobulines G et le taux d'anticorps antiinsuline. Parallèlement, nous avons dosé pour 30 diabétiques, à des périodes différentes, (soit 87 dosages) :
 - d'une part, les IgG par néphélométrie à l'aide d'une antiIgG, en méthode automatique (thèse Dessert Lyon)
 - d'autre part, le taux de fixation de l'insuline marquée aux IgG du sérum ($\frac{B}{T}$).

L'observation des résultats pour le même malade dans le temps permet de noter l'indépendance du taux d'anticorps antiinsuline par rapport à la concentration d'immunoglobulines G (tableau 7). Au contraire, l'ensemble de ces données nous a permis le calcul du coefficient de corrélation r . Il s'élève à 0,25 : c'est à dire après lecture de la table correspondante, qu'une liaison existe entre la concentration d'IgG du sérum et le taux d'anticorps antiinsuline, avec $\alpha = 5\%$. Mais ce coefficient α reflète, d'une part, les variations dans le temps pour le même malade ; et d'autre part, les dosages effectués pour des malades différents. Nous avons pensé annuler le facteur de variation dans le temps : pour ce faire, nous avons calculé la moyenne des taux IgG et anticorps pour chaque malade et déterminé le coefficient de corrélation sur 30 valeurs - $r = 0,297$, la liaison IgG-anticorps antiinsuline n'est pas significative si l'on considère les variations des deux paramètres pour des sujets différents.

2. L'interférence spécifique :

pourrait provenir de peptides, dont la structure proche de celle de l'insuline, contractent une liaison avec les anticorps antiinsuline. Il nous fallait donc vérifier la spécificité du système insuline - anticorps antiinsuline.

n°	Malade	date	mg % IgG	AC	n°	Malade	date	mg % IgG	AC
1	Bep.	17.11.75	1090	9,3 %	45	Sal.	7.11.74	1060	18,7 %
2		19. 3.76	1600	3,1 %	46		6. 5.75	1040	8,9 %
3	Bel.	26.10.73	1290	0	47		3.11.75	1030	16,6 %
4		25. 7.75	1290	22,6 %	48	Sma.	28. 6.74	1340	2,3 %
5		3. 4.76	1320	35,7 %	49		21. 3.75	1170	6,1 %
6	Ber.	10.12.74	1370	0	50		12.11.75	1130	1,5 %
7		9. 9.75	1620	16 %	51	Tho.	25. 7.75	1060	0,8 %
8	Czo.	29. 4.75	920	7,7 %	52		8.12.75	860	0,3 %
9		19. 8.75	1360	8 %	53		9. 4.76	890	0,2 %
10		27. 1.76	1290	33,4 %	54	Ama.	16. 4.76	1260	0
11	Bon.	4. 6.74	1410	40 %	55		28. 5.76	1410	0
12		3. 9.74	1560	20,7 %	56		27. 8.76	1460	0,7 %
13		1. 3.76	1720	9,6 %	57	Ber.	22. 3.76	1140	0,3 %
14	Cha.	27.11.74	630	10,7 %	58		28. 5.76	1370	0
15		25. 7.75	770	24,8 %	59		27. 8.76	1140	1,9 %
16		27. 8.76	680	7,9 %	60	Bro.	19. 2.75	1230	5,4 %
17	Del.	29. 3.74	960	30,7 %	61		8.12.75	1680	0,8 %
18		18. 6.74	1330	2,8 %	62		14. 4.76	1200	0,1 %
19		4. 5.76	1140	0,3 %	63	Cam.	8. 4.75	1350	0,2 %
20	Egi.	13. 3.75	990	11,9 %	64		2. 2.76	1030	1,2 %
21		19. 2.76	1440	26,8 %	65		28. 5.76	1060	0,3 %
22		30. 7.76	1150	9,9 %	66	Cel.	14. 4.76	1000	0,1 %
23	Mor.	2.12.75	880	22,8 %	67		28. 5.76	950	0
24		20. 3.76	1470	12,3 %	68		27. 8.76	990	0,7 %
25		30. 7.76	1430	9,4 %	69	Gra.	29.10.74	500	4,5 %
26	Pra.	1. 4.74	1140	10,9 %	70		24. 2.75	1060	15,8 %
27		28. 5.74	1060	19 %	71		25. 5.76	1050	13,8 %
28		16. 4.76	1170	5,6 %	72	Mar.	6. 6.74	1570	58 %
29	Sma.	4. 1.75	1030	0	73		17.11.75	1060	13,5 %
30		7. 4.75	950	68%pur	74	The.J	21. 3.75	1030	26,6 %
31		25. 7.75	1120	10,4 %	75		5. 5.76	1170	13,5 %
32		8.12.75	1020	6,5 %	76	Thev.A	26.12.74	1740	0,5 %
33	Tis.	14. 1.76	1810	0	77		6. 8.75	1300	2,8 %
34		28. 5.76	1650	21,4 %	78		1. 9.75	1260	2,8 %
35		27. 8.76	1460	31,5 %	79	Dev.	1. 9.75	1100	14,6 %
36	Ian.	2.10.74	2170	27,3 %	80		5. 1.76	1090	12,1 %
37		25. 7.75	1770	15,9 %	81		27. 1.76	930	11,3 %
38		16. 4.76	1170	7,9 %	82	Dif.	7.11.74	610	0,1 %
39	Mar.	20. 5.75	930	0	83		26. 5.75	690	14 %
40		28. 5.76	1440	18,7 %	84		15. 9.75	720	16 %
41		27. 8.76	1750	23,9 %	85	Fav.	10. 3.75	1230	2,3 %
42	Par.	4. 3.75	1610	15,8 %	86		25. 7.75	2030	2,1 %
43		21.11.75	2230	55,6 %	87		6. 8.75	1580	4,4 %
44		5. 5.76	2090	44,5 %					

Tableau n° 7 : Chez 30 diabétiques : dosage des immunoglobulines G (mg %) et des anticorps antiinsuline. Il n'existe pas de relation significative entre ces deux paramètres.

Pour affirmer cette spécificité, la condition nécessaire est que l'insuline froide déplace l'insuline marquée du complexe formé. Mais elle n'est pas suffisante : aussi avons nous réalisé les courbes de réaction croisée avec la proinsuline et le C peptide froids.

a. Conditions pratiques :

Dans une série de tubes, nous ajoutons :

- . l'hormone marquée -d'activité spécifique élevée 100 $\mu\text{ci}/\mu\text{g}$ - et en quantité constante = 90 pg
- . l'hormone froide en quantité croissante
- . le sérum antiinsuline sous un volume constant.

La dilution est choisie de façon à avoir 33 % de fixation de l'hormone marquée.

L'incubation dure 24 heures à + 4°C.

b. Représentation graphique :

Nous avons choisi d'exprimer le rapport $\frac{B^*}{T^*} = \frac{\text{hormone marquée liée}}{\text{hormone marquée libre}}$ en fonction de la quantité B d'hormone totale (marquée + froide) fixée par le sérum antiinsuline (85)

$$B = \frac{B^*}{T^*} \times T \times n$$

T est la quantité d'hormone totale introduite dans le milieu d'incubation exprimée en $\mu\text{g}/\text{ml}$.

n le facteur de dilution du sérum.

Pour les réactions croisées, nous avons porté le rapport $\frac{B^*}{B_0^*}$ en fonction de B : ainsi nous pourrions comparer les concentrations de deux hormones pour la valeur 50 % de $\frac{B}{B_0^*}$

c. Résultats :

1. L'insuline froide déplace-t-elle l'insuline marquée liée à l'anticorps ?

A 90 pg d'hormone marquée, sont rajoutées des concentrations croissantes d'insuline froide : les points extrêmes de la gamme sont de 0,0098 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 9,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'insuline totale (marquée + froide). Après électrophorèse, nous obtenons les valeurs de :

$$B^* = \text{activité de l'insuline liée à l'anticorps}$$

d'où $T^* - B^* = F^*$

Les calculs des rapports B^*/F^* B^*/T^* permettent le calcul de B et la représentation graphique $\frac{B}{F^*}$ f (B).

Nous rapportons les résultats obtenus pour un sérum dilué au tiers (tableau 8). En l'absence d'hormone froide, il fixe 37,6 % de l'hormone marquée.



figure 7 : Réaction à anticorps et traceur constants et antigène
froid variable : B/F f B

L'insuline froide déplace l'insuline marquée.

Hormone totale µg/ml	B*cp/mm	F*cp/mm	B*/F*	B*/T*	B picomoles par ml
0,0098	507	840	0,6036	0,3764	1,85
0,0799	330	1017	0,3245	0,2450	9,8
0,151	232	1115	0,2081	0,1723	12,93
0,292	160	1187	0,1348	0,1188	17,23
0,577	84	1263	0,0665	0,0624	17,78
1,145	70	1277	0,0549	0,0520	29,65
4,554	41	1306	0,0314	0,0305	69,4
9,10	31	1316	0,0236	0,0231	105,1

Tableau n° 8

La figure 7 $\frac{B^*}{F^*}$ en fonction de B permet :

- de montrer que l'insuline froide déplace bien l'insuline marquée de sa liaison avec l'anticorps. Cette compétition signifie la spécificité de l'anticorps vis à vis de l'insuline.
- en outre, de calculer les pentes ou constantes d'affinité des populations d'anticorps en présence : K1 et K2 et le nombre de sites Abo1 et Abo2. Nous avons pu obtenir ces résultats pour un certain nombre de nos malades. Ils sont consignés dans le troisième chapitre.

2. Recherche d'une réaction croisée avec la proinsuline froide :

A 90 pg d'insuline marquée sont rajoutées des concentrations croissantes de proinsuline : de 0,57 ng/ml à 18,2 ng/ml. Les résultats sont obtenus pour un diabétique dont le sérum est dilué au demi (B/T = 43 %)

Proinsuline froide ng/ml	B*/mm	F*/mm	B*/F*	B*/T*	B picomoles par ml
0	501	664	0,7546	0,4301	0
0,57	192	973	0,1974	0,1648	0,0209
1,13	134	1031	0,1300	0,1151	0,0290
2,25	113	1052	0,1075	0,0970	0,0486
4,50	81	1084	0,0748	0,0696	0,0696
9,1	64	1101	0,0582	0,0550	0,1113
18,2	42	1123	0,0374	0,0361	0,1461

Tableau n° 9

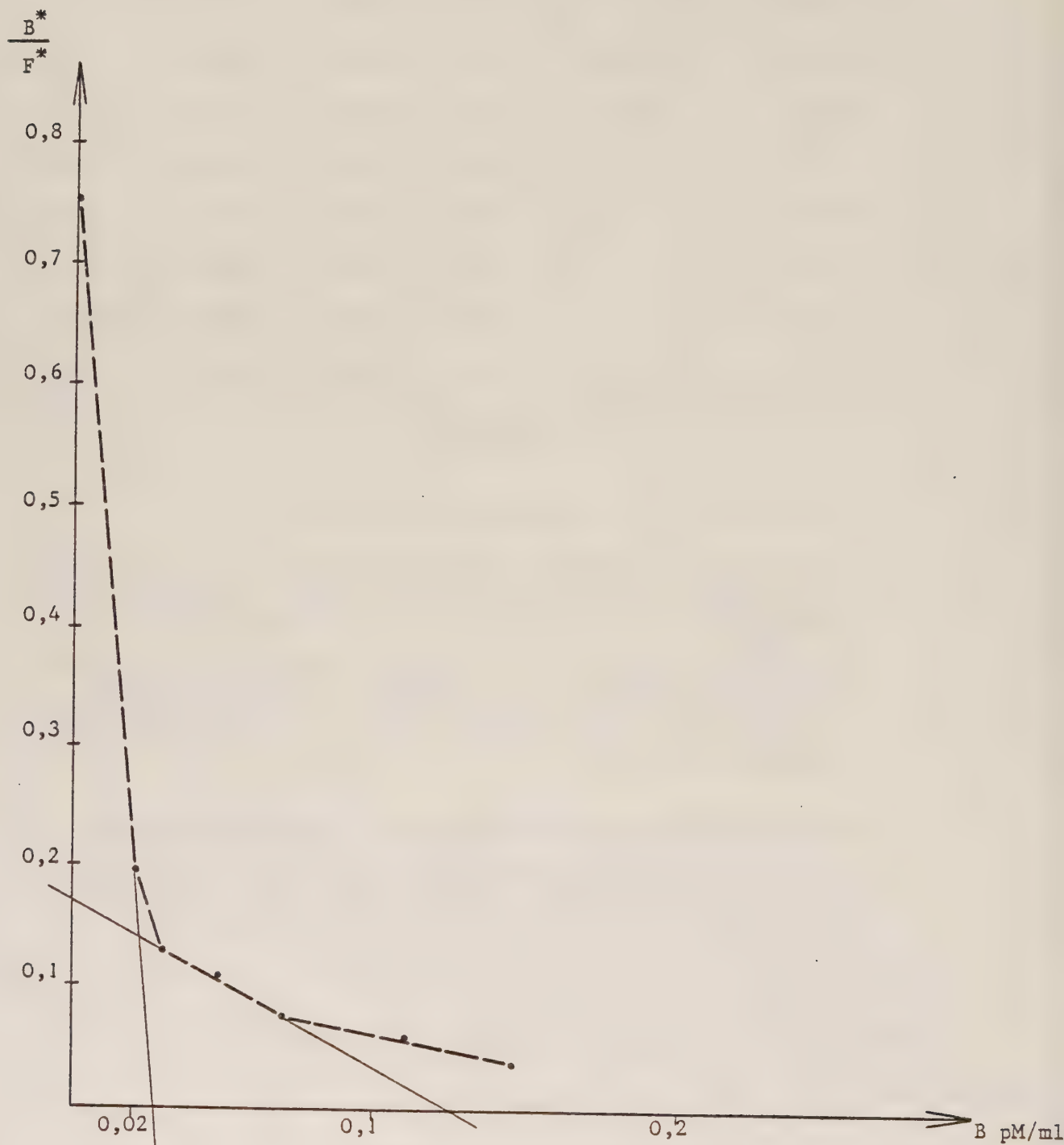


figure 8 : Réaction croisée du système insuline - anticorps antiinsuline avec la proinsuline.

La figure 8 montre que la proinsuline froide déplace l'insuline marquée de son complexe.

Afin d'évaluer l'importance de cette réaction croisée, nous traçons pour l'insuline et la proinsuline les courbes de $\frac{B}{B_0}$ en fonction de B (exprimé en ng/ml) chez le même malade. Les concentrations d'insuline et de proinsuline froides, qui déplacent 50 % de l'insuline marquée, sont déterminées (figure 9) :

56 ng/ml d'insuline
0,15 ng/ml de proinsuline.

Le rapport $\frac{\text{proinsuline}}{\text{insuline}}$ est égal à 0,0027.

Donc, la proinsuline interfère dans le système insuline-anticorps antiinsuline. Cette réaction croisée est de l'ordre de 0,3 %. Des courbes de compétition analogues, réalisées pour trois autres diabétiques II chiffrent cette réaction croisée à 0,3 % - 0,4 - 0,49 %.

3. Recherche d'une réaction croisée avec le peptide C :

Des concentrations croissantes de peptide C froid, extrêmes : 1,5 à 45,5 ng/ml, sont incubées avec l'insuline marquée et le sérum dilué au tiers (B/T = 29 %). La proportion d'hormone radioactive, liée aux anticorps, n'est pas influencée par le peptide C (tableau 10).

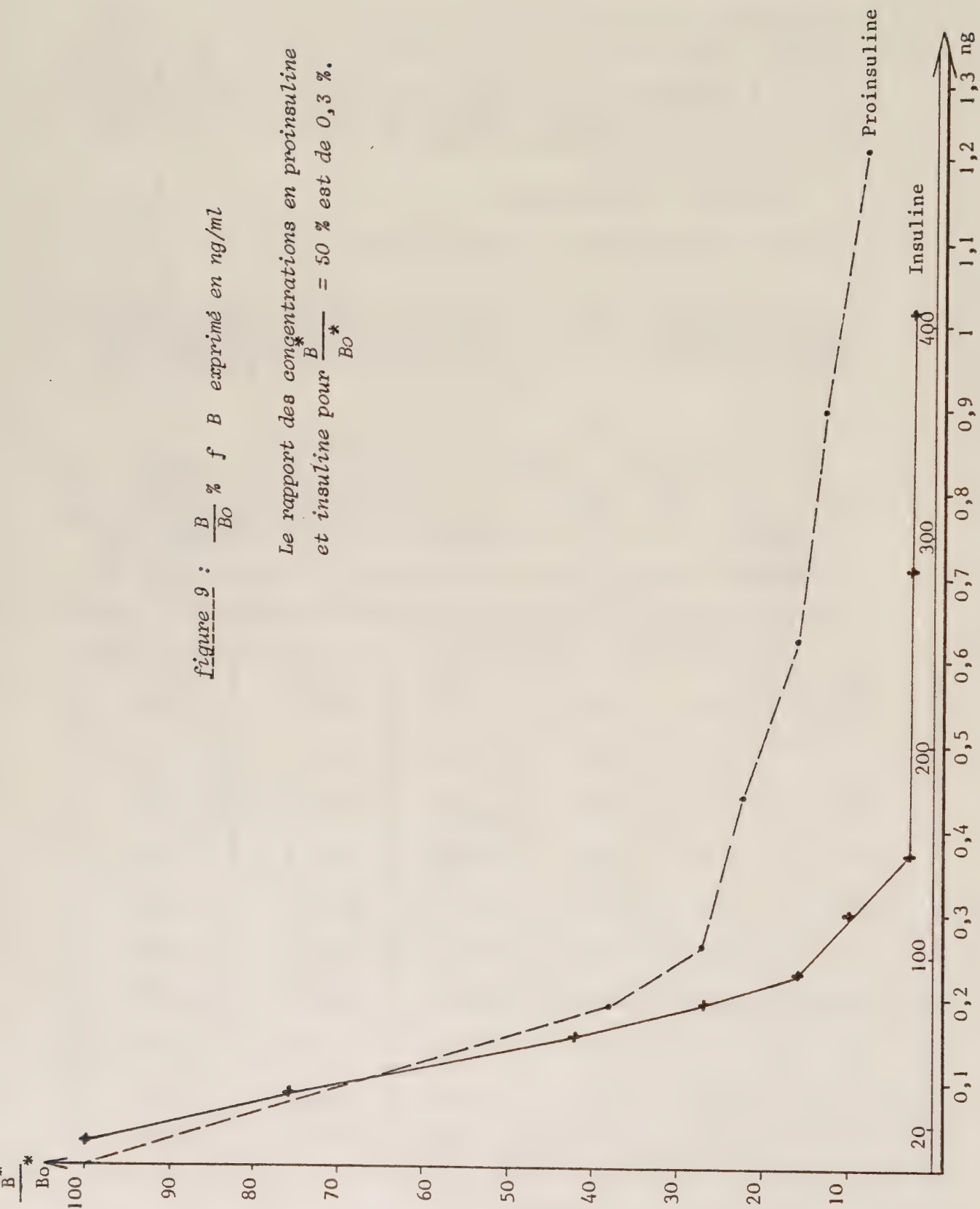
Les courbes obtenues, chez le même malade de la fonction $\frac{B}{B_0}$, le confirment (figure 10). Le peptide C n'interfère pas dans le système insuline-anticorps antiinsuline.

C Peptide ng/ml	B*/mn	F*/mn	B*/F*	B*/Bo*	B ng/m
0	309	1062	0,2910	100 %	0
0,20	305	1066	0,2862	98,71 %	0,1335
0,40	283	1088	0,2602	91,59 %	0,2478
0,80	280	1091	0,2567	90,62 %	0,4905
1,50	294	1077	0,2730	95,15 %	0,9654
5,70	204	1167	0,1748	66,02 %	2,5446
11,4	220	1151	0,1912	71,20 %	5,4891
22,8	234	1137	0,2058	75,73 %	14,74
45,5	225	1146	0,1964	72,82 %	22,41

Tableau n° 10

Figure 9 : $\frac{B}{B_0} \% f B$ exprimé en ng/ml

Le rapport des concentrations en proinsuline
et insuline pour $\frac{B}{B_0} = 50 \%$ est de 0,3 %.



Insuline B ng
ng/ml Proinsuline

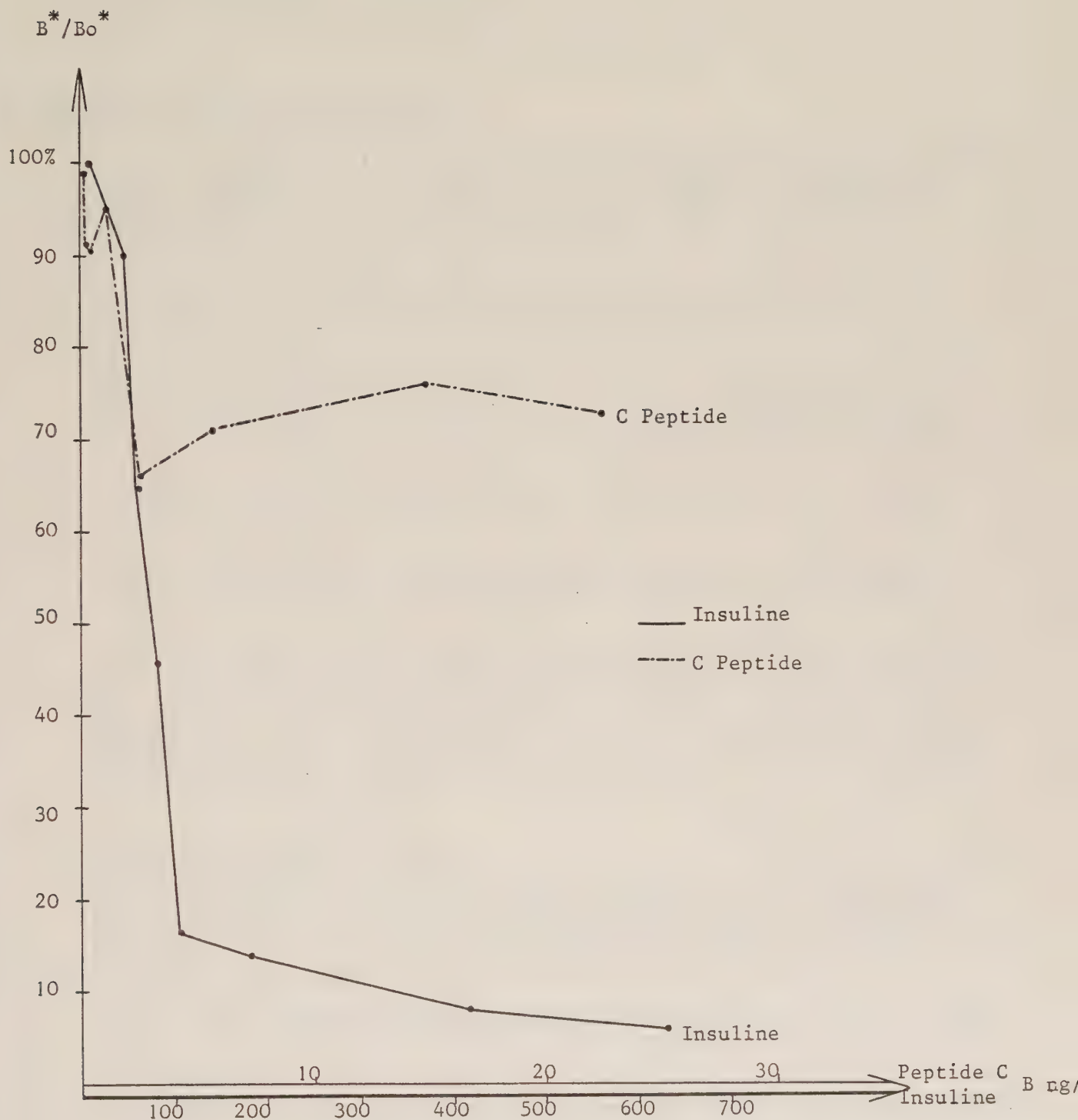


figure 10 : $+ \frac{B}{Bo}$ en fonction de B exprimé en ng/ml

Le C Peptide n'interfère pas dans le système insuline-anticorps antiinsuline.

Une discussion des éléments de méthodologie termine ce chapitre. Elle comprend deux paragraphes :

1. Discussion du choix de la méthode,
2. Discussion de la spécificité des anticorps antiinsuline.

I. DISCUSSION DU CHOIX DE LA METHODE :

Le choix de la méthode de CHRISTIANSEN est-il justifié ? Deux questions se posent. La première : quel avantage offre ce procédé de séparation, en comparaison des autres méthodes ? La seconde : l'étude des paramètres de l'électroimmunodiffusion est-elle satisfaisante ?

A. Pour répondre à la première question, nous préciserons, pour chaque procédé de séparation, ses avantages et ses inconvénients.

1. La méthode de YALOW et BERSON

bien sûr demeure la méthode de référence. Mais la séparation entre les deux fractions libre (F) et liée (B) est quelquefois rendue difficile, du fait de l'existence d'une trainée de radioactivité entre ces deux pics.

Celle-ci est due à l'hormone marquée, soit dégradée, soit liée aspécifiquement à une α_2 globuline.

Si l'on considère la fraction liée spécifiquement à l'insuline, il s'agit d'immunoglobulines, mais leur classe (IgG) n'est pas définie.

De plus, cette séparation sur papier conduit à une sensibilité $\frac{B}{T}$ faible : elle permet d'affirmer la présence d'anticorps pour un rapport $\frac{B}{T}$ égal à 5%. Et surtout, le taux d'anticorps, évalué sur le même sérum, varie avec le lot de papier de cellulose utilisé. Cet inconvénient nous a paru prépondérant : c'est pourquoi, désirant suivre l'évolution des anticorps antiinsuline chez un même malade au cours du temps, nous avons abandonné cette méthode de séparation.

2. La méthode du double anticorps

ne rallie pas tous les suffrages pour la détection des anticorps circulants. Elle oblige à déterminer la concentration optimale d'antigamma-globulines G humaines (deuxième anticorps) nécessaire pour précipiter le système insuline-anticorps antiinsuline (premier système).

Pour l'électroimmunodiffusion, les anti IgG sont introduites en excès dans le gel ; il n'est pas nécessaire d'en connaître le titre.

3. Les procédés de séparation par précipitation du complexe antigène-anticorps

conduisent à l'obtention, après adjonction d'alcool à 80° ou de sulfate d'ammonium 40 %, de volumineux précipités. Le précipité contient toutes les protéines sériques liées à l'hormone de manière spécifique ou non.

La classe d'immunoglobulines liée à l'insuline marquée n'est pas précisée.

L'inconvénient majeur réside dans le fait que 15 à 25 % du traceur peut être aspécifiquement entraîné dans le précipité, et ce, pour un sérum de sujet normal, dépourvu d'activité anticorps. Cette interférence élevée explique la faible sensibilité de ces procédés de séparation.

C'est pourquoi nous ne les avons pas retenus.

4. Le principal inconvénient de la filtration sur Sephadex réside dans sa faible maniabilité pour de grandes séries de dosage.

5. L'immunodiffusion d'OUCHTERLONY

précise le type d'immunoglobulines qui se lie à l'insuline par un arc de précipitation linéaire. Mais la radioactivité de cet arc correspond à celle du complexe insuline marquée-anticorps, et à celle de l'insuline restée libre qui a simplement diffusé. Cette méthode présente un intérêt surtout qualitatif.

Le bilan des inconvénients de ces méthodes nous font comprendre l'intérêt :

- . de connaître la classe d'immunoglobulines qui se lie à l'insuline marquée,
- . du problème de l'interférence non spécifique,
- . du seuil de détection,
- . de la reproductibilité d'une méthode et
- . de sa maniabilité pour de grandes séries de dosage.

B. La méthode de CHRISTIANSEN réunit-elle toutes ces qualités ?

1. La classe IgG représente la fraction anticorps qui se lie à l'insuline (49). La méthode de CHRISTIANSEN révèle cette liaison par précipitation de ces IgG avec un sérum de lapin anti IgG humaines.

2. L'interférence non spécifique :

- a. L'activité de la fraction $\alpha 2$ liée à l'insuline marquée n'est pas significativement différente de celle correspondant au bruit de fond du compteur.
- b. Nous voulions savoir si le taux des globulines G du sérum pouvait faire varier le taux d'anticorps antiinsuline, car en 1976 CZYZYK (21) rapporte les faits suivants : dans le décours d'une hépatite virale, d'affection grippale grave, de polyvaccination, il observe une augmentation du taux d'anticorps antiinsuline.

L'infection stimulerait l'immunoréactivité de l'organisme à l'égard de l'insuline exogène.

Nous avons précisé que le taux d'anticorps est indépendant de la concentration d'immunoglobulines G du sérum.

3. Le seuil de détection déterminé sur des sérums normaux est très faible = 0,2 %.
4. Les reproductibilités intra et intersystème sont relativement bonnes, puisque le coefficient de variation analytique atteint respectivement 10 et 16 %, valeurs comparables à celles que l'on obtient ordinairement, en radioimmunologie.
5. Enfin, la méthode de CHRISTIANSEN s'adapte parfaitement aux grandes séries de dosage. Nous disposons, au laboratoire, de 4 cuves qui permettent de tester, lors d'une manipulation, 48 sérums. Le délai avec lequel nous pouvons rendre un résultat est de quatre jours.

Ainsi, cette méthode d'électroimmunodiffusion élégante, maniable est valable. Certes, elle traduit un pourcentage d'insuline marquée liée aux IgG du sérum et non un dosage réel, en poids, d'anticorps. Elle reflète, nous le verrons, la constante d'affinité des anticorps les plus avides.

II. DISCUSSION DE LA SPECIFICITE DU SYSTEME ETUDIE :

Les anticorps antiinsuline, élaborés par le diabétique insulino-dépendant, sont spécifiques de l'insuline.

L'étude des réactions croisées permet de mettre en évidence une réaction croisée avec la proinsuline. Cependant, cette interférence est faible, de l'ordre de 0,3 %. Le Peptide C n'intervient pas dans la formation du complexe insuline-antiinsuline.

En conclusion

La méthode que nous avons choisie est fiable. Le système antigène-anticorps étudié possède une bonne spécificité : dès lors, nous pouvons procéder à la recherche des anticorps antiinsuline chez le diabétique insulino-dépendant.

- C H A P I T R E I I I -
=====

- R E S U L T A T S -

Ce chapitre se compose de trois parties :

- . La première partie rapporte les résultats d'anticorps antiinsuline chez 528 sujets dont 440 diabétiques insulino-dépendants.
- . Dans la seconde partie, figurent les résultats des constantes d'affinité et du nombre de sites des anticorps antiinsuline.
- . La troisième partie est consacrée aux anticorps antiproinsuline chez 100 diabétiques insulino-dépendants.

PREMIERE PARTIE : ANTICORPS ANTIINSULINE CHEZ 528 SUJETS

Nous rapportons les résultats d'anticorps antiinsuline de 528 sujets dont 440 diabétiques insulino-dépendants : ils se répartissent comme suit :

- . Groupe I : 88 sujets témoins : sujets normaux, obèses ou diabétiques I, en tous cas, n'ayant jamais reçu d'injection d'insuline.
- . Groupe II : 19 diabétiques insulino-dépendants pour lesquels la durée de l'hormonothérapie n'excède pas 3 mois.
- . Groupe III: 373 diabétiques insulino-dépendants traités par les insulines traditionnelles, pour des périodes variant de une à plusieurs années.
- . Groupe IV : 21 diabétiques primo-insulinés : 9 par une insuline traditionnelle, 12 par l'insuline monocomposée.
- . Groupe V : 27 malades d'abord traités par une insuline traditionnelle, ont bénéficié des insulines monocomposées.

Les modalités du traitement seront précisées avant les résultats d'anticorps proprement dits.

A. LES INSULINES UTILISEES :

1. Insuline protamine ZINC = IPZ^R

- . origine : bovine
- . pH = 7 en tampon phosphate
- . concentrations pour 100 unités :
 - protamine : 1,25 mg
 - zinc : 0,2 mg
- . quelquefois associée à

2. L'insuline ordinaire = IO^R

3. Neutral Protamine Hagedorn = NPH^R

- . origine : bovine
- . pH = 7,25 ± 0,15 en tampon phosphate
- . protamine 0,45 mg pour 100 unités.
- . pas de zinc

4. Rapitard ^R

- . origine : bovine et porcine avec :
 - 25 % d'insuline cristallisée dissoute de porc
 - 75 % d'insuline cristallisée en suspension de boeuf
- . pH = 7 en tampon acétate
- . zinc : traces

5. Durasuline ^R

- . origine : bovine
- . pH = $7,25 \pm 0,05$ en tampon phosphate
- . concentration pour 100 unités :
 - protamine : 0,9 mg
 - zinc : 0,100 mg

6. Mixte Zinc Novolente ^R

- . origine : bovine dont :
 - 30 % de l'insuline zinc est amorphe et
 - 70 % de l'insuline zinc cristallisée
- . pH = 7 tampon acétate
- . zinc : 0,2 mg pour 100 unités
- . pas de protamine.

7. Les nouvelles insulines monocomposées ou "MC"

L'élution sur colonne de Sephadex G.50 d'une insuline de porc, cristallisée une seule fois, permet à STEINER et son équipe (97) d'individualiser 3 fractions a-b-c-, soumises à une discoélectrophorèse.

- . la fraction "a", de poids moléculaire supérieur à 12.000, comprend des "peptides insulín-like" et des protéines non précipitables, d'origine pancréatique animale.
- . la fraction "b", de poids moléculaire 9.000, contient surtout de la pro-insuline, de l'insuline dimère, de l'arginine-insuline.
- . la fraction "c" se compose d'insuline contaminée par des quantités variables de monoarginine insuline, diarginine insuline, diinsuline éthylée, de mono-et di-désamidoinsuline.

L'insuline monocomposée ^{*} "MC", de poids moléculaire 6.000, ne renferme ni les fractions "a" et "b", ni les dérivés insuliniques de la fraction "c".

B. CONDITIONS DU TRAITEMENT :

Outre l'insulinothérapie, deux facteurs essentiels contribuent à l'équilibre satisfaisant du diabète : ce sont, d'une part, le régime alimentaire, d'autre part, la surveillance biologique simple et précise.

a. Le régime

La ration alimentaire du diabétique insulínodépendant est adaptée pour couvrir ses besoins énergétiques, sans l'exposer ni à une surcharge pondérale, ni à un amaigrissement. Notion fondamentale : le poids du diabétique bien équilibré, demeure stable.

L'horaire de la piqûre d'insuline et des apports alimentaires doit être le plus fixe possible, pour le même sujet.

Les besoins en hormone varient avec l'activité physique.

Enfin, le diabétique correctement éduqué saura reconnaître les symptômes de l'hypoglycémie et y pallier par l'absorption préventive, nécessaire mais non excessive d'hydrates de carbone.

b. La surveillance biologique :

1. en cours d'équilibration du diabète, elle fait appel :
 - . au cycle glycémique : à jeun, 11 h, 14 h, 17 h, 20 h, 24 h.
 - . aux glycosuries fractionnées et recherche d'acétone sur les urines recueillies de 7 h. à 11 h. - 11 h. à 19 h. - 19 h. à 7 h. le lendemain.
2. Lorsque l'équilibre est atteint :
 - . La surveillance triquotidienne qualitative par le malade des présences de sucres et d'acétone dans les urines.
 - . La glycémie à jeun permet de juger de l'effet retard de l'insuline injectée.
 - . La glycosurie de 24 heures mensuelle : si certains auteurs tendent, à l'heure actuelle, à maintenir la glycosurie aussi basse que possible, voire nulle, d'autres tolèrent une quantité de sucre dite de sécurité comprise entre 10 et 40 g/24 h.

Ce bref rappel de l'équilibre entre régime alimentaire (poids) et besoins en insuline (glycosurie) chez le diabétique nous offre la possibilité de mentionner que chaque dose quotidienne d'insuline indiquée dans nos résultats, sous entend un état d'équilibre satisfaisant.

c. LES RESULTATS D'ANTICORPS ANTIINSULINE PROPREMENT DITS :

Le nombre de malades que nous avons pu tester du point de vue anticorps antiinsuline, nous a permis de répondre à plusieurs questions.

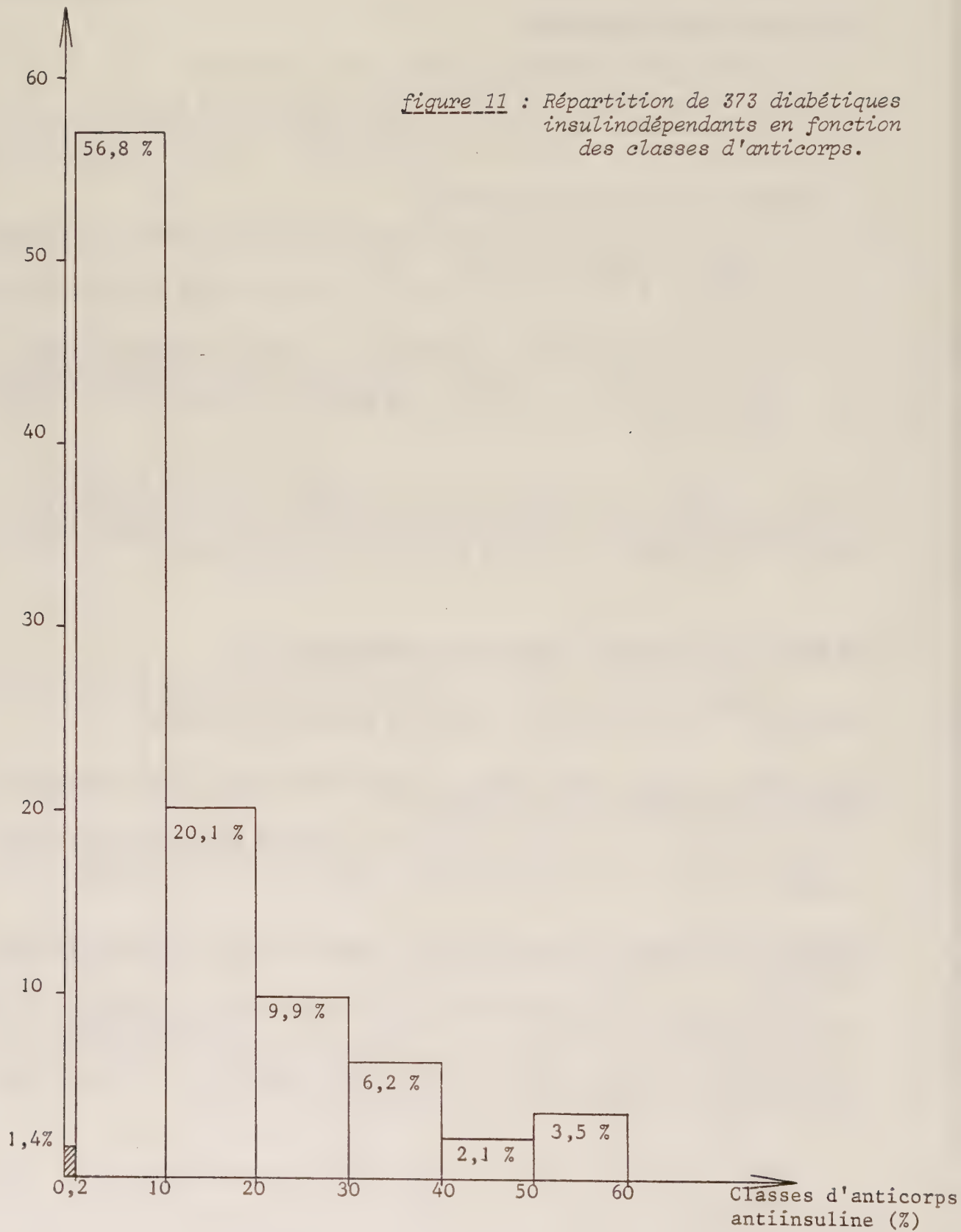
1. Les sujets, choisis comme témoins, n'ayant jamais reçu d'insuline, possèdent-ils des anticorps antiinsuline ?

Non, parmi les 88 sujets du groupe I, aucun ne montre une fixation de l'insuline marquée supérieure à 0,20 %, seuil limite de détection de la méthode.

2. Quelle est la latence d'apparition des immunoglobulines G anticorps anti-insuline ?

Le groupe II des 19 diabétiques, traités à l'insuline pour des périodes toutes inférieures à 3 mois, se comportent comme les sujets témoins : ils ne possèdent pas d'anticorps. La surveillance trimestrielle du taux d'anticorps, chez les primoinsulinés du groupe IV, démontre leur présence entre le troisième et sixième mois du traitement.

Pourcentage de
diabétiques insu-
linodépendants



3. Parmi les diabétiques insulino-dépendants, traités depuis plus de trois mois, combien possèdent des anticorps anti-insuline ?

- a. 368 malades sur les 373 du groupe III accusent la présence d'anticorps, soit 98,6 %.

Afin de connaître le profil de cette population de 373 diabétiques, nous évaluons nos résultats en pourcentage de sujets, en fonction du taux d'anticorps répartis en 7 classes :

. 0	-	0,2 %
. 0,2	à	10 %
. 10	à	20 %
. 20	à	30 %
. 30	à	40 %
. 40	à	50 %
. supérieur	à	50 %.

La figure 11 montre que 56,8 % des 373 diabétiques traités à l'insuline possèdent un taux d'anticorps compris entre 0,2 et 10 %.

- b. 5 malades sur 373, soit 1,4 %, ne "répondent" pas, du point de vue immunologique, aux injections journalières d'insuline, puisqu'ils ne fabriquent pas d'anticorps.

Nous rapportons une observation qui illustre ce fait. Monsieur THO... est âgé de 30 ans, pèse 59 kg pour 1m68, lorsque son diabète est découvert en janvier 1956. Dès lors, il reçoit 60 unités d'insuline protamine zinc.

Le 25 juillet 1975, soit 19 ans après le début de l'insulinothérapie, est effectué le dosage des anticorps anti-insuline. Monsieur THO... est traité par 30 unités d'insuline ultralente et 8 unités d'insuline semi lente amorphe, ses anticorps sont à 0,8 %. Un contrôle de ses anticorps, le 8 décembre 1975, décèle 0,3 % de fixation. Ses besoins en insuline n'ont pas varié.

Un troisième dosage, sous 34 unités d'insuline ultralente et 10 unités d'insuline amorphe, montre le 9 avril 1976 une fixation de 0,2 %. La détection des anticorps est identique à celle d'un sujet témoin, n'ayant jamais reçu d'insuline.

Ce malade, bien équilibré sur le plan de son diabète est suivi en consultation tous les six mois.

Les bilans clinique (cardio-vasculaire, oculaire) et biologique (glycosuries, lipidique, rénal) s'avèrent satisfaisants.

Aucune complication dégénérative du diabète n'est apparue chez cet homme traité à l'insuline depuis 20 ans.

4. Existe-t-il une corrélation entre la dose d'insuline nécessaire et le taux d'anticorps ?

Nous avons choisi de déterminer le coefficient de corrélation "r" entre la dose journalière d'insuline et le titre d'anticorps pour :

- . n = 270 diabétiques
- . r égale 0,2471

Indice	Taux AC	IP2+IO 24 malades	IP2 62 malades	NPH 35 malades	Rapitard 13 malades	Durasuline 56 malades	MZN 94 malades	MC 12 malades
1	0-0,20 %	4 % 4	0 % 0	0 % 0	8 % 8	11 % 11	6,5 % 6,5	16,7 % 16,7
2	0,20-10 %	38 % 76	48 % 96	54 % 108	38 % 76	32 % 64	64 % 128	83,3 % 166,6
3	10-20 %	29 % 87	18 % 54	14,3 % 42,9	23 % 69	32 % 96	15 % 45	
4	20-30 %	17 % 68	16 % 64	11,5 % 46	15 % 60	18 % 72	7,5 % 30	
5	30-40 %	0 0	10 % 50	14,3 % 71,5	8 % 40	3,5 % 17,5	5 % 25	
6	40-50 %	0 0	3 % 18	0 0	8 % 48	3,5 % 21	1 % 6	
7	> 50 %	12 % 84	5 % 35	6 % 42	0 % 0	0 % 0	1 % 7	
Total des indices		319	317	310,4	301	281,5	247,5	183,3

Tableau n° 11 : La somme des produits (indices x pourcentages de malades) permet de présumer la capacité immunogène de l'insuline considérée.

$$t = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \cdot \sqrt{n - 2} = 4,1746$$

La référence, à la table de la variable de Student t , nous montre qu'il existe une liaison positive entre les besoins journaliers en insuline et le taux d'anticorps antiinsuline. Cette relation est significative à 1 % près.

5. D'autres auteurs (87-99) s'étant assurés de l'indépendance des anticorps antiinsuline en fonction de l'âge du diabète, du sexe, du poids du malade, nous avons tenté de savoir si la réponse immunologique variait selon l'insuline injectée.

296 diabétiques (groupe III) sont classés en fonction du type d'insuline utilisée, d'une part, et de leur taux d'anticorps d'autre part.

Le nombre de malades, inégal pour les différentes insulines, peut cependant être comparé, une fois traduit en pourcentage. Nous avons attribué l'indice :

- 1 à l'intervalle d'anticorps compris entre 0 et 0,20 %
- 2 à l'intervalle d'anticorps compris entre 0,20 et 10 %
- 3 à l'intervalle d'anticorps compris entre 10 et 20 %
- 4 à l'intervalle d'anticorps compris entre 20 et 30 %
- 5 à l'intervalle d'anticorps compris entre 30 et 40 %
- 6 à l'intervalle d'anticorps compris entre 40 et 50 %
- 7 à l'intervalle d'anticorps supérieure à 50 %.

Pour chaque insuline : IPZ^R - IO^R - IPZ^R - NPH^R - $Rapitard^R$ - $Durasuline^R$ - MZN^R - Monocomposées MC^R , nous avons effectué le produit (indice x pourcentage de malades) avant d'effectuer la somme des produits, ou somme des indices. Cette somme reflète, pour chaque type d'insuline, la capacité d'induire la formation d'anticorps. Aussi, plus cette somme est élevée, plus l'insuline est dite immunogène. Le tableau 11 rend compte de ces résultats.

Le test de $X^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{\bar{x}}$ est effectué en considérant les données selon une seule entrée $\bar{x}$.

- x est la somme des produits pour chaque insuline,
- $\bar{x}$ la moyenne des sommes des produits
- X^2 égal 29,3377, nous montre, pour 6 degrés de liberté (classe -1) une valeur supérieure au X^2 avec $\alpha = 5\%$ (12,952) et même à $\alpha = 1\%$ (22,457). Cela revient à dire que la différence entre les classes est hautement significative.

En conclusion : L'insuline IPZ^R s'avère la plus immunogène d'autant plus si elle est associée à l'insuline ordinaire. La NPH^R et la $Rapitard^R$ provoqueront l'élaboration d'anticorps moins que l' IPZ^R mais plus que la $Durasuline^R$ et la MZN^R . Dès à présent, on peut noter la bien moindre antigénicité de l'insuline monocomposée.

N° Durée	Nom	Date	Dose/j insuline MC	AC	N° Durée	Nom	Date	Dose/j insuline traditionnelle	AC
1 6 mois	Ama..	16. 4.76 →28. 5.76 27. 8.76 8.10.76	— 16 MC 20 MC 15	0 0 0,7 % 1,4 %	1 1 an 10 mois	Bel..	→16.10.73 26.10.73 21. 6.74 23.12.74 26. 6.75 25. 7.75 1. 9.75 3. 4.76	15 IO 15 IO 55 IPZ 45 IPZ 28 34 34 26	0 0 16,4 % 24,1 % 27,7 % 22,6 % 27,2 % 35,7 %
2 1 mois	And..	→19. 2.76 19. 3.76	20 MC 20	0 0,4 %	2 9 mois	Tis..	5. 1.76 14. 1.76 28. 5.76 27. 8.76 15.10.76	7jours IO 50 à 80 MZN 80 MZN 48 52 54	0 0 21,4 % 31,5 % 34,7 %
3 1 an 7 mois	Ber..	9. 6.75 →22. 3.76 28. 5.76 27. 8.76 20.10.76	2glucinan 4euglucan 25 MC 20 18 20	0,1 % 0,3 % 0 1,9 % 0,2 %	3 1 an 4 mois	Egi..	→15.10.74 13. 3.75 25. 5.75 7. 7.75 19. 2.76	25 IPZ 26 Dura 35 Dura 48 Dura 44 Dura	0 11,9 % 21,1 % 23,2 % 26,8 %
4 1 an 6 mois	Cam..	8. 4.75 →4. 5.75 2. 2.76 28. 5.76 27. 8.76 15.10.76	2glucidoral 2 glucinan 10 MC 15 15 15 15	0,2 % 0 1,2 % 0,3 % 1,9 % 1,3 %	4 1 3 mois	Mar..	→20. 5.75 28. 5.76 27. 8.76	20 Dura 20 Dura 25	0 18,7 % 23,9 %
5 1 an	Cel..	18.10.75 14. 4.76 →28. 5.76 27. 8.76 27.10.76	Euglucan Euglucan 28 MC 27 38	0 0,1 % 0 0,7 % 0,6 %	5 1 an 5 mois	And..	→Janvier74 28. 5.74 7.10.75	— 33 IPZ 40 IPZ	— 6,9 % 35,7 %
6 5 mois	Duj..	18. 5.76 →21. 5.76 27. 8.76 27.10.76	— 20 MC 15 24	0 0 0,8 % 7,3 %	6 4 mois	Bar..	→25. 5.76 10. 9.76	— 15 IPZ	0 20,1 %
7 10 mois	Dur..	→10.12.74 4. 3.75 18. 9.75 1. 4.76 30. 7.76 18. 8.76 18.10.76	30 MC 5IO 30 30 30 30 30+30Actr "	0,2 % 1,4 % 0,5 % 0 0,2 % 0,2 % 1,2 %	7 9 mois	Ber..	→10.12.74 2. 5.75 9. 9.75	— 32 Dura 35 Dura	0 6,4 % 16 %
8 4 mois	Lej..	→1. 6.76 15. 6.76 27. 8.76 27.10.76	20 MC 38 38 40	0 0 0,1 % 1,1 %	8 9 mois	Bou..	→15. 6.74 27. 9.74 15. 3.75	— 16 Rapit 16 "	0 6 % 6,9 %
9 4 mois	Pec..	→Mai 76 15. 6.76 15.10.76	— 20 MC 15	— 0 0,6 %	9 3 mois	Sma..	4. 1.75 7. 4.75 29. 4.75	11jours25IO 110 MZN 90 MZN	0 68%(38 au dem 57,7% (47,7 demi)
10 5 mois	Poc..	→28. 5.76 27. 8.76 21.10.76	17 MC 17 17	0 0,2 % 0,6 %	<u>Tableau n° 12</u> Diabétiques primoinsulinés (MC et traditionnelles). Evolution des besoins en hormone et du taux d'anticorps. → indique la date du début de l'insulinothérapie.				
11 7 mois	Pom..	15. 3.75→ 6. 2.76 22. 5.76 15.10.76	Côma:27IO 12 MC 12 15	0,26% 0,9 % 9,4 % 1 %					
12 5 mois	Vil..	→27. 3.76 20. 5.76 3. 7.76 30. 8.76	Euglucan 5 MC sevrage —	0,2 % 0,4 % — 0,2 %					

6. En relation avec le résultat précédent, l'étude des anticorps antiinsuline des malades du groupe IV pouvait nous apporter ou non une confirmation. L'insuline monocomposée utilisée d'emblée chez des diabétiques de découverte récente, induit-elle un taux d'anticorps moindre par rapport aux insulines traditionnelles ?

Pour ces 21 diabétiques, l'indication d'insulinothérapie était formelle, soit parce qu'ils se rangeaient dans le groupe de diabète II à révélation tardive ; soit diabète intermédiaire : diabète de l'adulte n'ayant jamais présenté un excédent de poids ; soit diabète métabolique : sujet ayant été obèse et épuisé son pancréas ; enfin, diabète secondaire à une pancréatite calcifiante. Cette classification "étiopathogénique" a peu d'importance. L'indication de l'insulinothérapie a été décidée du fait de l'existence d'un amaigrissement massif, des glycosuries dans les urines de 24 heures élevées avec quelquefois présence d'acétone, parfois même d'un début d'acidocétose.

Dans tous les cas, le dosage de l'insuline plasmatique effectuée sous tolbutamide a révélé, à postériori, la déchéance de la sécrétion endocrine.

Ces malades hospitalisés lors de la découverte du diabète subissaient des bilans clinique et biologique complets, puis étaient suivis, tous les trois mois, en consultation.

Le tableau 12 détaille aux dates précises, la dose quotidienne d'insuline et le dosage d'anticorps.

L'examen comparatif objective, d'emblée, une nette différence entre les anticorps produits par les 12 diabétiques traités à l'insuline monocomposée et les 9 primoinsulinés par l'insuline traditionnelle. Mais la durée d'observation de ces deux catégories de malades n'est pas rigoureusement identique. Pour pallier à cet handicap, nous avons choisi de comparer les moyennes des besoins en hormone et des taux d'anticorps induits, aux mêmes périodes d'insulinothérapie (tableau 13) :

- . chez 10 primoinsulinés par la monocomposée,
- . et 9 primoinsulinés par les insulines traditionnelles.
- La moyenne des anticorps induits par les insulines monocomposées : 1,6 % est significativement différente de la moyenne 20,8 % des anticorps induits par les insulines traditionnelles ($t = 3,09$).
- au contraire,
- La moyenne journalière des besoins d'insuline traditionnelle : 39,9 unités n'est pas significativement différente de celle d'insuline monocomposée : 22,7 unités ($t = 1,72$).

Notons toutefois, que l'approche d'un équilibre satisfaisant du diabète a été plus courte et plus facile avec l'insuline monocomposée, en comparaison de l'insuline traditionnelle. En contre partie, la durée d'action de l'insuline monocomposée s'avèrait plus brève que celle de l'insuline traditionnelle : nous avons pu remarquer, chez les primoinsulinés à la MC, des glycémies à jeun plus élevées que chez les neuf autres diabétiques.

Ainsi : *l'insuline monocomposée utilisée d'emblée, à période égale, induit moins d'anticorps antiinsuline que les insulines traditionnelles.*

N°	Durée	Nom	Insuline MC	AC	N°	Durée	Nom	Insuline tradit.	AC
1	5 mois	Ama..	15 MC	1,4 %					
3	5 mois	Ber..	18 MC	1,9 %	4	1 an	Mar..	20 Dura	18,7 %
4	8 mois	Cam..	15 MC	1,2 %	1	8 mois	Belb.	55 IPZ	16,4 %
5	5 mois	Cel..	38 MC	0,6 %	3	5 mois	Egi..	26 Dura	11,9 %
6	5 mois	Duj..	24 MC	7,3 %	5	5 mois	And..	33 IPZ	6,9 %
7	9 mois	Dur..	30 MC	0,5 %	8	9 mois	Bou..	16 Rap.	6,9 %
8	4 mois	Lej..	40 MC	1,1 %	6	4 mois	Bar..	15 IPZ	20,1 %
9	4 mois	Pec..	15 MC	0,6 %	9	3 mois	Sma..	110 MZN	68,1 %
10	5 mois	Poc..	17 MC	0,6 %	7	5 mois	Ber..	32 Dura	6,4 %
11	7 mois	Pom..	15 MC	1 %	2	7 mois	Tis..	52 MZN	31,5 %

Tableau n° 13 : Comparaison des besoins en hormone et taux d'anticorps antiinsuline après une même durée d'insulinothérapie monocomposée ou traditionnelle.

Nom	Durée entre les do- sages	Insuline tradit. (1)	Insuline M.C. (2)	% chute besoins	Différence besoins	AC ₁	AC ₂	% chute anticorps	Différence anticorps
Abo.	11 mois	40 IPZ	20 MC	50 %	- 20	20,2 %	13,7 %	32 %	- 6,5
Bar.	1 an 1 mois	40 IPZ	33 MC	17 %	- 7	15,7 %	22,7 %	-31 %	+ 7
Bon.	2 ans 3 mois	40 MZN	37 MC	7,5 %	- 3	40 %	5,6 %	86 %	- 34,4
Bro.	1 an 8 mois	20 Dura.	10 MC	50 %	- 10	3,5 %	1,4 %	60 %	- 2,1
Gaz.	2 ans 3 mois	40ultraL	46 MC	-15 %	+ 6	40,9 %	13,7 %	66,5 %	- 27,2
Chan.	2 ans	36 MZN	24 MC	33 %	- 12	10,7 %	9,2 %	14 %	- 1,5
Char.	1 an 3 mois	20 MZN	20 MC	0	0	24,2 %	1,7 %	93 %	- 22,5
Del.	2 ans 5 mois	55 Dura	20 MC	63 %	- 35	30,7 %	1 %	96,7 %	- 29,7
Egi.	1 an 7 mois	44 Dura	30 MC	32 %	- 14	26,8 %	23 %	14 %	- 3,8
Fig.	8 mois	50 IPZ	40 MC	20 %	- 10	22 %	18,6 %	15 %	- 4,4
Jea.	10 mois	35 MZN	30 MC	14 %	- 5	4,7 %	1,3 %	72 %	- 3,4
Lab.	2 ans 3 mois	33 MZN	20 MC	39 %	- 13	13,8 %	12,7 %	8 %	- 1,1
Lhe.	1 an	52 MZN	35 MC	32 %	- 17	6 %	4,3 %	28 %	- 1,7
Lio.	2 ans 2 mois	27 MZN	20 MC	26 %	- 7	28,2 %	23,8 %	15 %	- 4,4
Maz.	1 an 4 mois	45ultraL	45 MC	0	0	7,8 %	4,6 %	41 %	- 3,2
Meh.	1 an 3 mois	55 MZN	58 MC	- 5 %	+ 3	15 %	52 %	-71 %	+ 37
Mor.	1 an 6 mois	33 NPH	30 MC	9 %	- 3	20,7 %	9,4 %	54 %	- 11,3
Pir.	2 ans	32 MZN	25 MC	22 %	- 7	35,5 %	29 %	18 %	- 6,5
Pec.	8 mois	30 IPZ	27 MC	10 %	- 3	34,3 %	31,8 %	7 %	- 2,5
Pra.	2 ans 4 mois	30 MZN	32 MC	- 6 %	+ 2	19 %	5,1 %	73 %	- 13,9
Pro.	3 ans 1 mois	90 IPZ	35 MC	61 %	- 55	33,9 %	18,5 %	45 %	- 15,4
Reb.	4 mois	65 MZN	40 MC	38 %	- 25	8,8 %	6,8 %	22,7 %	- 2
Rib.	23 jours D.C.D.	30 MZN	25 MC	17 %	- 5	33,4 %	23 %	31 %	- 10,4
Sma.	8 mois	110 MZN	40 MC	63 %	- 70	46,7 %	3,2 %	93 %	- 43,5
Vit.	10 mois	70 NPH	40 MC	43 %	- 30	8,3 %	10,7 %	-29 %	+ 2,4
Bur.	9 mois	36 IPZ	30 MC	16 %	- 6	18,4 %	11,3 %	38 %	- 7,1
Ber.	1 an	35 Dura	30 MC	14 %	- 5	16 %	4,9 %	69 %	- 11,1

Tableau n° 14 : Passage de l'insuline traditionnelle à la MC - Besoins et AC chez 27 diabétiques.

7. Existe-t-il un intérêt quant à la réponse anticorps, à remplacer l'insuline traditionnelle par l'insuline monocomposée ?

Les 27 malades du groupe V ont vu leur thérapeutique modifiée ; les périodes d'observation varient de 23 jours à 3 ans et 1 mois. Pour chacun d'eux, nous avons mentionné (tableau 14) :

- . d'une part, la dose d'insuline traditionnelle, puis celle d'insuline M.C., le pourcentage de chute des besoins et la différence entre elles, étant entendu que le malade était, pour chacune des doses, bien équilibré.
- . d'autre part, le taux d'anticorps sous insuline traditionnelle, sous insuline M.C., le pourcentage de chute et la différence entre les deux dosages.

Résultats :

- . 24 malades sur 27 diminuent leurs A.C.
- . 22 malades sur 27 diminuent leurs besoins
- . 20 malades sur 27 diminuent et leurs A.C. et leurs besoins.

Le tableau 15 rapporte les réponses simultanées en besoins et en anticorps antiinsuline.

<i>Besoins</i> <i>A.C.</i>				<i>Total</i>
	20	2	2	24
	2	0	1	3
<i>Total</i>	22	2	3	27

Tableau n° 15

-  = diminution
 = pas de changement
 = augmentation

A l'aide de ces résultats, nous avons tenté de répondre à plusieurs questions :

- a. La différence observée entre les doses utiles d'insulines traditionnelle et M.C. est-elle significative ?
- b. Question identique en ce qui concerne les différences des taux d'anticorps.
- c. Existe-t-il une relation entre la différence des besoins et celle des anticorps pour ces 27 malades ?

- d. Les résultats de ce groupe de 27 malades peuvent être "élargis" : au sein d'une population, placée dans les mêmes conditions de traitement, quels pourcentages :

α diminuerait son taux d'AC
 β diminuerait ses besoins en insuline
 γ diminuerait ses anticorps et ses besoins

Aux deux premières questions, nous avons choisi de tester nos résultats en tenant compte des 2 hypothèses possibles :

- il n'y a pas de diminution du paramètre besoins (ou AC)
- il y a diminution du paramètre.

Le coefficient de Student est égal à $t = \frac{D - 0}{\sqrt{\frac{s^2}{N}}}$

où D représente la moyenne des différences (en tenant compte du signe - s'il y a diminution et + en cas d'augmentation).

N = nombre des mesures (27)

$$s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}$$

x : est la différence des paramètres besoins (ou anticorps) pour chaque malade.

$\bar{x}$: la moyenne des différences.

a. Différence en besoins :

Nous pouvons dire qu'une différence significative existe entre les doses d'insulines traditionnelles et M.C. avec $\alpha = 1\%$ puisque $t = 3,8891$.

$$(t_{25}^{1\%} = 3,725)$$

b. Différence en anticorps antiinsuline :

t est égal à 2,8722 : l'on doit admettre une différence significative entre les taux d'anticorps obtenus sous insulines traditionnelle et MC. Cette différence est significative à 1 % près $(t_{25}^{1\%} = 2,787)$

c. Liaison entre besoins et anticorps :

Pour chacun des 27 malades, nous nous sommes intéressée à la différence entre les besoins d'une part, et les anticorps d'autre part. Celle-ci est notée négative dans le cas d'une diminution, positive si besoins, ou anticorps augmentent, nulle dans le cas d'un chiffre inchangé.

Le coefficient r de corrélation est égal à 0,4343 : pour cette valeur avec 25 degrés de liberté, la table correspondante nous enseigne qu'une relation existe entre ces 2 paramètres. Le risque $\alpha = 5\%$ est la valeur limite pour admettre que la liaison entre besoins et anticorps est significative.

d. Résultats au sein d'une population :

Nous adoptons de déterminer l'intervalle de confiance du pourcentage =

po représente le pourcentage de malades qui diminuent ses besoins (ou ses anticorps).

qo le pourcentage de malades qui, au contraire, n'offre pas cette particularité.

α Diminution en anticorps

24 malades sur 27 diminuent leurs AC, soit $po = 88,9 \%$ et $qo = 11,1 \%$.

l'intervalle de confiance des deux pourcentages est pour :

$po = 73 \% - 98 \%$

$qo = 2 \% - 27 \%$.

Autrement dit, dans une population 73 à 98 % des sujets traités, dans les mêmes conditions, diminueront leurs anticorps.

β Diminution des besoins

22 malades sur 27 ont diminué leurs doses d'insuline journalières.

En fait, dans une population diabétique 67,6 à 93,4 % des sujets pourraient présenter le même avantage.

γ La diminution simultanée des anticorps et des besoins est trouvée dans notre groupe, chez 20 malades sur 27, soit 74% des cas. Ce qui représenterait 58,8 à 89,7 % d'une population.

En résumé : 98,6 % des diabétiques insulino-dépendants possèdent des anticorps anti-insuline. Nous pouvons souligner la moindre antigénicité des insulines monocomposées.

Un anticorps est défini par son avidité pour l'antigène : qu'en est-il pour les anticorps anti-insuline ?

Malade	Traitement	AC %	$K1$ L/M	$K2$ L/M	Abo1 M/L	Abo2 M/L
Pru...	80 IPZ 15 IO	30,2 % au demi	$0,25 \cdot 10^9$	$0,20 \cdot 10^7$	$0,7 \cdot 10^{-8}$	$0,18 \cdot 10^{-6}$
Mur...	55 IPZ	37,4 %	$0,41 \cdot 10^8$	$0,61 \cdot 10^7$	$0,25 \cdot 10^{-5}$	$0,86 \cdot 10^{-7}$
Fré...P.	40 IPZ	28,2 %	$0,33 \cdot 10^8$	$0,64 \cdot 10^7$	$0,19 \cdot 10^{-7}$	$0,37 \cdot 10^{-7}$
Fré...A.	35 IPZ	31,6 %	$0,10 \cdot 10^8$	$0,14 \cdot 10^7$	$0,68 \cdot 10^{-7}$	$0,14 \cdot 10^{-6}$
Poe...	30 IPZ	34,3 %	$0,18 \cdot 10^9$	$0,31 \cdot 10^7$	$0,2 \cdot 10^{-8}$	$0,84 \cdot 10^{-7}$
Del...	55 Dura	30,7 %	$0,83 \cdot 10^8$	$0,23 \cdot 10^7$	$0,13 \cdot 10^{-7}$	$0,54 \cdot 10^{-7}$
Chat..	15 NPH 10 IO	27,3 % au demi	$0,26 \cdot 10^8$	$0,3 \cdot 10^6$	$0,48 \cdot 10^{-7}$	$0,11 \cdot 10^{-5}$
Rib...	30 MZN	33,4 %	$0,10 \cdot 10^9$	$0,10 \cdot 10^7$	$0,5 \cdot 10^{-8}$	$0,28 \cdot 10^{-6}$
Meh...	55 MZN	29,8 %	$0,84 \cdot 10^8$	$0,27 \cdot 10^6$	$0,55 \cdot 10^{-7}$	$0,15 \cdot 10^{-5}$
Sma...	100 MZN	46,7 % au demi	$0,14 \cdot 10^9$	$0,59 \cdot 10^7$	$0,16 \cdot 10^{-7}$	$0,84 \cdot 10^{-7}$
moyenne $\bar{x}$	51 unités ins.lente	.32,2% pur .34,7% 1/2	$0,15 \cdot 10^9$	$0,10 \cdot 10^7$	$0,17 \cdot 10^{-7}$	$0,51 \cdot 10^{-6}$

Tableau n° 16 : Constantes d'affinité et nombre de sites des anticorps antiinsuline chez 10 diabétiques traités par une insuline de boeuf.

DEUXIEME PARTIE : CONSTANTES D'AFFINITE ET NOMBRE DE SITES DES ANTICORPS

ANTIINSULINE

Les courbes de compétition $\frac{B^*}{F^*}$ f (B) entre l'insuline froide et l'insuline radioactive, vis à vis d'un sérum antiinsuline, permettent d'obtenir la preuve de l'existence de deux populations d'anticorps (11).

La détermination des deux pentes renseigne sur les constantes d'avidité K1 et K2 des anticorps (exprimées en litres/mole = L/M). Le prolongement des deux tangentes coupent l'axe des abscisses aux points $B_1 = Abo1$ et $B_2 = Abo2$ qui représentent le nombre de sites anticorps, pour chaque population (exprimés en moles/litre = M/L).

De telles courbes ont pu être réalisées chez des diabétiques II :

- . Groupe I : 10 malades traités par l'insuline de boeuf,
- . Groupe II : 4 diabétiques traités par l'insuline de porc M.C.

Ces deux groupes vont être comparés.

Les variations des constantes K1 - K2 et le nombre de sites Abo1 et Abo2 seront rapportées pour un malade diabétique au cours du temps.

1. Groupe I

Pour dix malades, nous connaissons la dose d'insuline, le taux d'anticorps. Nous déterminons les quatre paramètres K1 - K2 - Abo1 - Abo2. La moyenne est calculée (tableau 16).

Il existe bien deux populations anticorps :

la première se caractérise par une constante d'affinité élevée (K1) et un nombre de sites faible (Abo1)

la seconde, au contraire, possède pour un nombre de sites plus important (Abo2) d'une avidité moindre (K2).

2. Groupe II

Quatre diabétiques, d'abord traités par une insuline de boeuf traditionnelle, ont bénéficié d'insuline de porc M.C. Chacun a diminué ses anticorps antiinsuline et ses besoins en hormone. Les résultats des constantes d'affinité et sites-anticorps sont consignés dans le tableau 17.

Malade	Traitement	AC %	$K1_{L/M}$	$K2_{L/M}$	$Abo1_{M/L}$	$Abo2_{M/L}$
Pru...	25 + 12 semi lente	27,3 %	$0,4 \cdot 10^7$	$0,64 \cdot 10^6$	$0,1 \cdot 10^{-6}$	$0,43 \cdot 10^{-6}$
Rib...	14 + 11 semi lente	30,5 %	$0,86 \cdot 10^8$	$0,28 \cdot 10^7$	$0,5 \cdot 10^{-8}$	$0,96 \cdot 10^{-7}$
Poe...	28	26,1 %	$0,27 \cdot 10^7$	$0,2 \cdot 10^6$	$0,14 \cdot 10^{-6}$	$0,98 \cdot 10^{-6}$
Meh...	45	27,2 %	$0,41 \cdot 10^7$	$0,94 \cdot 10^6$	$0,17 \cdot 10^{-6}$	$0,58 \cdot 10^{-6}$
$\bar{y}$	33,7 U. ins.porc	27,8 %	$0,24 \cdot 10^8$	$0,11 \cdot 10^7$	$0,10 \cdot 10^{-6}$	$0,52 \cdot 10^{-6}$

Tableau n° 17

Les constantes d'affinité obtenues à la suite d'un traitement à l'insuline de porc paraissent moins élevées que celles des sujets traités par l'insuline bovine.

Si l'on compare les moyennes des chiffres obtenus pour les 14 malades des 2 groupes, seule la différence entre les constantes d'affinité $K1$ apparaît significative ($t = 2,275$) avec un risque α de 5 %.

Si l'on compare (tableau 18) les moyennes obtenues chez les quatre malades, d'abord traités par l'insuline bovine puis par la monocomposée, cette liaison se confirme avec $t = 2,905$ et $\alpha = 5$ %.

Insuline	$K1_{L/M}$	$K2_{L/M}$	$Abo1_{M/L}$	$Abo2_{M/L}$
Boeuf	$0,15 \cdot 10^9$	$0,16 \cdot 10^7$	$0,17 \cdot 10^{-7}$	$0,51 \cdot 10^{-6}$
Porc	$0,24 \cdot 10^8$	$0,11 \cdot 10^7$	$0,10 \cdot 10^{-6}$	$0,52 \cdot 10^{-6}$

Tableau n° 18

Moyennes des constantes d'affinité et des sites anticorps obtenues chez 4 malades, d'abord traités par une insuline de boeuf puis par une insuline de porc MC.

3. Variations des constantes d'affinité et des sites anticorps, au cours du temps :

Nous rapportons les résultats des constantes d'affinité et des sites anticorps effectués chez un diabétique II.

La conservation des sérums a permis une étude comparative qui porte sur deux ans.

Date	Traitement	AC %	K1 L/M	K2 L/M	Abo1 M/L	Abo2 M/L	Nombre total sites AC Abo1 + Abo2
13. 3.74	80 IPZ 15 IO	34,3 %	$0,93 \cdot 10^7$	$0,98 \cdot 10^6$	$0,56 \cdot 10^{-7}$	$0, 3 \cdot 10^{-6}$	$0,35 \cdot 10^{-6}$
20. 9.74	75 IPZ 15 IO sérum au demi	25,5 %	$0,28 \cdot 10^8$	$0,15 \cdot 10^7$	$0,17 \cdot 10^{-7}$	$0,21 \cdot 10^{-6}$	$0,22 \cdot 10^{-6}$
4. 2.75	80 IPZ 15 IO sérum au demi	30,2 %	$0,25 \cdot 10^9$	$0,20 \cdot 10^7$	$0,70 \cdot 10^{-8}$	$0,18 \cdot 10^{-6}$	$0,18 \cdot 10^{-6}$
25. 7.75	40 + 19 semi lente MC	38,1 %	$0,20 \cdot 10^8$	$0,12 \cdot 10^7$	$0,20 \cdot 10^{-7}$	$0,43 \cdot 10^{-6}$	$0,17 \cdot 10^{-6}$
8.12.75	40 + 21 semi lente MC	44,9 %	$0,69 \cdot 10^8$	$0,95 \cdot 10^7$	$0,52 \cdot 10^{-8}$	$0,21 \cdot 10^{-7}$	$0,26 \cdot 10^{-7}$
31. 5.76	25 + 12 semi lente	27,3 %	$0,40 \cdot 10^7$	$0,64 \cdot 10^6$	$0, 1 \cdot 10^{-6}$	$0,42 \cdot 10^{-6}$	$0,53 \cdot 10^{-6}$
16.11.76	35 MC lente	37 %	$0,83 \cdot 10^8$	$0,30 \cdot 10^7$	$0,90 \cdot 10^{-8}$	$0,80 \cdot 10^{-7}$	$0,89 \cdot 10^{-7}$

Tableau n° 19

Variations des constantes d'affinité et du nombre de sites anticorps au cours du temps, pour le même malade.

Mr. Pru..., traité par 80 unités d'IPZ^R et 15 unités d'IO^R, présente le 13 mars 1974 : 34,3 % d'anticorps. La constante K1 est de $0,93.10^7$ L/M et K2 égale $0,98.10^6$ L/M. Le nombre total de sites anticorps est de $0,35.10^{-6}$ Moles/litres.

Le taux d'anticorps antiinsuline augmente pour atteindre 30,2 % le 4 février 1975 sur le sérum dilué au demi. K1 surtout est élevée $0,25.10^9$ L/M, K2 = $0,20.10^7$ L/M. Le nombre de sites anticorps est de $0,18.10^{-6}$ M/l. Ce sujet est alors traité par l'insuline de porc lente MC. Son taux d'anticorps diminue, 27,3 % (31.5.76), ainsi que les constantes d'affinité K1 - K2, alors que le nombre de sites passe à $0,53.10^{-6}$ M/l.

Le tableau 19 nous montre, lorsque l'affinité de la première population d'anticorps augmente, que le nombre de sites diminue. Dans l'ensemble taux d'anticorps et nombre de sites varient en sens inverse l'un de l'autre.

En somme :

Le taux d'anticorps antiinsuline reflète la constante d'affinité de la population anticorps la plus avide. Il ne traduit pas un nombre de sites anticorps.

La constante K1 :

- . est élevée lorsque le malade est traité par une insuline bovine,*
- . suit l'évolution du taux d'anticorps antiinsuline : diminue lorsque l'insuline est porcine, monocomposée.*

TROISIEME PARTIE : ANTICORPS ANTIPROINSULINE CHEZ LE DIABETIQUE INSULINODEPENDANT

KUMAR, en 1973, apporte la preuve de l'existence d'anticorps antiproinsuline chez les diabétiques de type II (55-56). Nous ne pouvions clore cette étude des anticorps antiinsuline, sans vérifier ce fait.

Nous rapportons les méthodes de dosage et nos résultats.

1. METHODES : Elles diffèrent par les composants de l'incubation.

. Première incubation :

On met en présence le sérum du malade avec la proinsuline marquée. La proinsuline se lie aux IgG du sérum, la séparation proinsulines liée et libre s'effectue par électroimmunodiffusion.

La proinsuline peut se lier faiblement aux antiinsuline présents dans le sérum puisque la réaction croisée a été chiffrée à 0,3 %. C'est pourquoi, il faut pratiquer une :

. Seconde incubation :

Dans un premier temps, le sérum du malade diabétique est incubé avec une quantité d'insuline froide en excès : (500 ng/ml). Les anticorps anti-insuline vont ainsi se trouver bloqués par l'hormone froide.

Dans le deuxième temps, seulement, est rajoutée la proinsuline marquée à l'iode 125. On procède alors à la séparation.

Nous avons vérifié que les anticorps antiinsuline, présents dans le sérum, étaient bien bloqués par l'hormone froide : l'insuline marquée introduite dans le deuxième temps, à la place de la proinsuline radioactive, ne se lie plus aux IgG du sérum.

2. MALADES : 100 diabétiques insulino-dépendants se répartissent en 3 groupes.

- . Groupe I : 10 sujets témoins normaux, n'ayant jamais reçu d'insuline,
- . Groupe II : 78 diabétiques traités par les insulines traditionnelles (non MC)
- . Groupe III : 12 diabétiques traités par l'insuline de porc monocomposée.

<i>Malades</i>	<i>anticorps antiinsuline B/T</i>	<i>anticorps antiproinsuline B/T</i>
Ber..	1,9 %	0,2 %
Lej..	1,1 %	0
Pec..	0,6 %	0
Poc..	0,6 %	0
And..	1,1 %	0
Vil..	0,5 %	0
Ama..	1,4 %	1 %
Cam..	1,9 %	1,5 %
Cel..	0,7 %	1 %
Duj..	7,3 %	4 %
Dur..	1,2 %	0,8 %
Pom..	1 %	0,5 %
moyenne =	1,6 %	0,7 %
Ecart type s	1,85	1,1 %

Tableau n° 20

Anticorps antiinsuline et antiproinsuline chez 12 diabétiques primoinsulinés à la M.C.

3. RESULTATS :

Pour tous ces malades, nous connaissons le taux d'anticorps anti-insuline.

Nous avons procédé aux deux incubations précitées. Mais nous ne rapporterons ici que les résultats d'anticorps antiproinsuline spécifiques, après avoir bloqué les anticorps antiinsuline par l'hormone froide.

Premier groupe :

Les 10 sujets témoins, qui ne possèdent pas d'anticorps antiinsuline, n'ont pas d'anticorps antiproinsuline.

Deuxième groupe :

Les 78 malades, qui possédaient des anticorps antiinsuline, contactent tous une liaison avec la proinsuline marquée. Si la moyenne des antiinsuline pour ces malades est de $12,4 \% \pm 1,1$ (SEM), le taux moyen d'anticorps antiproinsuline s'élève à $22,1 \% \pm 1,1$ (SEM).

Il existe une corrélation entre les anticorps antiinsuline et antiproinsuline, le coefficient r calculé pour ce groupe est de 0,79. La liaison entre ces deux paramètres est très significative, supérieure à 1 %.

Troisième groupe :

12 diabétiques traités par la monocomposée :

- . 6 malades possédant des antiinsuline ne renferment pas d'anticorps antiproinsuline.
- . les 6 autres possèdent les deux catégories d'anticorps. Pour ces 6 diabétiques : la moyenne des antiinsuline est de 2,2 %, celle des antiproinsuline à 1,5 %.

Si l'on considère le taux moyen d'antiproinsuline pour les 12 diabétiques traités à la monocomposée de porc, il est de 0,7 % pour 1,6 % d'anticorps anti-insuline.

Le test de t , utilisé pour juger de la différence entre diabétiques traités par l'insuline traditionnelle et l'insuline monocomposée s'avère très significatif : $t = 7,33$ avec un risque α supérieur à 1 %.

Le tableau ci-contre(20) récapitule les résultats pour les 12 diabétiques traités à la monocomposée.

En résumé : L'existence d'anticorps antiproinsuline chez le diabétique II est une réalité. Il semble que la proinsuline présente dans les préparations d'insulines traditionnelles soit responsable de ces anticorps, puisque l'insuline monocomposée, débarrassée de la proinsuline, induit des anticorps antiproinsuline mais à un taux très faible (moyenne 0,7 %) et chez un malade sur deux.

- C H A P I T R E I V -
=====

- D I S C U S S I O N -

La discussion de ce chapitre se compose de trois paragraphes :

- . le premier fera la comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature,
- . le second essaiera de cerner les facteurs éventuellement responsables de l'élaboration d'anticorps anti-hormone,
- . le troisième tentera de dégager l'intérêt de cette étude et les problèmes qu'elle pose.

A. DISCUSSION DES RESULTATS :

1. Les sujets témoins n'ont jamais reçu d'insuline et ne possèdent pas d'anticorps anti-insuline.

Tous les auteurs rapportent ce résultat, à l'exception de HIRATA et OHNEDA (44,45,74). Ces auteurs décèlent des anticorps chez des malades qui n'ont jamais reçu d'insuline. Il s'agit d'autoanticorps anti-insuline : nous en reparlerons.

2. Les anticorps apparaissent après une immunisation de trois mois. Cette latence semble nécessaire à l'information des cellules immunocompétentes, et à la réponse humorale. Cependant, si elle est nécessaire, elle n'est pas suffisante puisque :
3. 1,4 % des diabétiques traités depuis plusieurs années par l'insuline ne fabriquent pas d'anticorps. Il faut admettre un facteur personnel de réceptivité ; nous avons rapporté l'observation d'un diabétique traité à l'insuline depuis 20 ans, qui ne possède pas d'anticorps. Pour DEVLIN (26), tout diabétique insulino-dépendant, traité depuis plus d'un an, qui ne produit pas d'anticorps anti-insuline, est un sujet non répondeur.
4. 98,6 % des 373 diabétiques insulino-dépendants, traités depuis plus de trois mois, fabriquent des anticorps : ANDERSEN n'observe leur présence que dans 76 % des cas (1) et DEVLIN dans 82 % des cas (26). Notre pourcentage est comparable à celui de CHRISTIANSEN (19) : parmi 267 diabétiques II, 97 % possèdent des IgG anti-insuline.

Nous avons trouvé une liaison positive, significative (1 %) entre le taux d'anticorps et la dose d'insuline : cette relation n'est pas toujours retrouvée dans les travaux antérieurs .

5. Chez 27 diabétiques II, l'insuline traditionnelle a été remplacée par l'insuline monocomposée :

- a. Pour 24 d'entre eux, ils représentent 73 à 98 % d'une population, on observe une chute des anticorps : ce résultat est comparable à celui de KORP et LEVETT (53): 8 de leurs diabétiques sur 9 diminuent leurs anticorps. LUYCKX (63) introduit une restriction: Il ne rapporte une chute des anticorps que pour les diabétiques dont le taux d'anticorps, sous insuline traditionnelle, est de 6 %. Pour lui, en deçà de 6 %, l'insuline monocomposée ne modifie pas la fixation des IgG à l'insuline.
- b. 22 diabétiques sur 27, soit 67 à 93,4 %, d'une population, diminuent leurs besoins en insuline. LUYCKX retrouve cette chute des besoins chez 9 patients sur 19. Pour ses 9 diabétiques, la dose moyenne d'insuline traditionnelle s'élevait à 50 unités/jour.
- c. 20 malades sur les 27 diminuent, simultanément, leurs anticorps et leurs besoins. C'est-à-dire que 58 à 89 % d'une population pourraient présenter les mêmes avantages. KORP et LEVETT (53) notent cette chute parallèle pour 3 malades sur 8 ; nos résultats donnent à penser que l'insuline monocomposée est plus efficace que ne l'écrivent ces auteurs. Mais le nombre de leurs malades est faible. Et, partant des résultats de 27 diabétiques, nous avons choisi de calculer l'intervalle de confiance du pourcentage.

6. Nous avons pu surveiller deux groupes de malades primoinsulinés :

La découverte récente de leur diabète insulino-prive imposait l'opothérapie 12 d'entre eux recevaient une insuline monocomposée, les 9 autres une insuline traditionnelle : la réponse humorale provoquée par la MC montre une moyenne anticorps de 1,6 %, significativement très différente de celle induite par l'insuline traditionnelle 20,8 %.

Au contraire, la différence entre les besoins en hormone (22,7 unités de MC et 39,9 U. d'insuline traditionnelle) n'est pas significative, du point de vue statistique. DEVLIN (26) rapporte des résultats comparables :

. moins de 20 % de ses 42 diabétiques primoinsulinés possèdent des anticorps.

. les moyennes anticorps induites sont de 0,3 % pour l'insuline MC et de 0,8 % seulement pour l'insuline traditionnelle. Pour DEVLIN, la différence des besoins n'apparaît pas significative : 18 à 31 unités de MC et 52 à 97 unités d'insuline traditionnelle.

KORP et LEVETT (53) notent l'apparition d'anticorps chez 18 primoinsulinés par la MC sur 22, avec une moyenne de 1,4 %. La moyenne des besoins varie de 8 à 40 unités.

7. L'étude des caractéristiques des anticorps a confirmé l'existence de deux populations, notion apportée par YALOW et BERSON en 1956 (11) :

La première population anticorps est définie par une constante d'affinité K1 élevée et un nombre de sites faible. La seconde population compte un nombre plus élevé de sites, mais leur affinité pour l'insuline K2 est plus faible.

Les constantes calculées par YALOW et BERSON sont, pour K1, de l'ordre de 10^8 à 10^9 L/M et pour K2 10^6 à 10^7 L/M. Elles sont identiques à celles que nous avons définies.

L'autre donnée classique est que l'insuline de boeuf induit des anticorps beaucoup plus avides que l'insuline de porc.

Nos résultats vérifient ce fait :

- . pour l'insuline de boeuf : K1 = $0,15 \cdot 10^9$ L/M et
K2 = $0,16 \cdot 10^7$ L/M
- . pour l'insuline de porc : K1 = $0,24 \cdot 10^8$ L/M et
K2 = $0,11 \cdot 10^7$ L/M.

Ils permettent de dire que le taux d'anticorps reflète la constante d'affinité K1. Les variations constatées, de la constante K2 et des nombres de sites anticorps, ne sont pas corollaires du taux d'anticorps antiinsuline. Il faut donc admettre que l'avidité pour l'insuline des sites anticorps de la première population est prépondérante. Plus l'avidité est élevée, plus le taux d'anticorps sera important. Ainsi, le taux d'anticorps, qui chute lorsqu'on remplace l'insuline traditionnelle par l'insuline monocomposée chez le diabétique, traduit une diminution de l'avidité du premier anticorps pour l'insuline.

8. Les travaux de KUMAR et MILLER (55,56) rapportent, dès 1973, la présence d'anticorps antiproinsuline dans le sérum des diabétiques traités à l'insuline.

Les anticorps antiproinsuline se lient spécifiquement à la proinsuline : il n'existe pas de réaction croisée avec l'insuline (RUBENSTEIN -88-KERP -51-, CHANCE -16-); alors que les anticorps antiinsuline réagissent faiblement avec la proinsuline.

Désirant vérifier ce fait, nous avons recherché ces anticorps antiproinsuline, en prenant soin de bloquer les anticorps antiinsuline par un excès d'insuline froide. Les 78 diabétiques traités avec une insuline traditionnelle (non MC), qui possèdent des anticorps antiinsuline, ont synthétisé des anticorps antiproinsuline. Une corrélation significative existe entre les deux paramètres. Au contraire, sur 12 malades primoinsulinés par l'insuline monocomposée, 6 seulement produisent des anticorps antiproinsuline. Les moyennes d'antiproinsuline sont bien différentes : 22,1 % pour l'insuline traditionnelle et 0,7 % pour l'insuline monocomposée.

Cette notion d'anticorps antiproinsuline est intéressante pour deux raisons :

La première : les IgG spécifiques antiproinsuline ne lient pas l'insuline, donc ils n'interfèrent pas sur les besoins, en insuline, nécessaires à l'équilibre du diabète.

La seconde : L'insuline monocomposée induit très peu d'anticorps antiinsuline et antiproinsuline : la composition du soluté injectable d'insuline pourrait être déterminante dans la fabrication d'anticorps. C'est ce que nous allons tenter de préciser dans le paragraphe suivant.

B. LES FACTEURS EVENTUELLEMENT RESPONSABLES DE L'ELABORATION D'ANTICORPS :

L'insuline ne devrait pas jouer le rôle d'antigène du fait de la taille de la molécule : PM = 6000.

Aussi, la découverte, par YALOW et BERSON, d'anticorps antiinsuline induits par la thérapeutique posait la question : quels facteurs déclenchent l'immunisation ? La diversité des hypothèses émises reflète bien la difficulté de cerner la ou les causes du processus acquis.

1. Rôle de la structure primaire de l'hormone injectée :

L'administration d'une insuline hétérologue, chez l'animal, provoque l'apparition d'anticorps. Si l'insuline de porc ne diffère de l'insuline humaine que par un seul acide aminé, les différences de structure primaire sont plus importantes entre l'insuline bovine et humaine = 4 acides aminés. Et, l'insuline de boeuf est plus antigénique pour l'homme que l'insuline de porc. Donc, la séquence des acides aminés semble importante. Mais deux observations s'imposent :

- . d'une part, l'injection d'insuline homologue à l'animal induit la formation d'anticorps (80,82),
- . d'autre part, pour nous, l'IPZ^R et la NPH^R sont les deux insulines traditionnelles les plus antigéniques. Leur origine animale est bovine mais la Durasuline^R, elle aussi, provient du pancréas de boeuf et nous a semblé moins antigénique.

Nous ne pouvons donc pas affirmer que la structure primaire de l'insuline ne joue aucun rôle, mais son pouvoir d'induire des anticorps est partagé avec le

2. Rôle de la structure tertiaire de l'insuline, du fait de l'obtention d'anticorps après injection chez l'animal d'insuline homologue.

RENOLD stipule que l'insuline extraite du pancréas, purifiée et injectée, diffère de l'insuline endogène circulante (80) : soit du fait d'une liaison insuline-protéines, soit par une différence de la conformation spatiale de la molécule, donc du site antigène.

3. Rôle de la structure quaternaire

MIRSKY (69) émet l'hypothèse d'une big - insuline formée par polymérisation.

4. Rôle de la composition galénique du soluté injectable :

L'insuline lente est solubilisée en milieu tamponné, en présence de zinc et de protamine. Ces constantes sont rapportées dans le tableau 21.

<i>Insuline</i>	<i>Origine</i>	<i>Tampon</i>	<i>Zinc pour 100 U</i>	<i>Protamine pour 100 U</i>
IPZ ^R	boeuf	Phosphate	0,2 mg	1,25 mg
NPH ^R	boeuf	phosphate	0	0,45 mg
Rapitard ^R	boeuf+porc	acétate	traces	0
Durasuline ^R	boeuf	phosphate	0,1 mg	0,9 mg
MZN ^R	boeuf	acétate	0,2 mg	0

Tableau n° 21

Tout comme pour l'origine animale de l'insuline, le rôle de tampon phosphate des préparations les plus immunogènes, l'IPZ^R, la NPH^R, n'est pas le seul facteur inducteur d'anticorps, puisque la Durasuline^R moins antigénique, est aussi tamponnée par le phosphate.

De même, la concentration en zinc est identique pour l'IPZ^R, préparation très antigénique et la MZN^R moins antigénique. La quantité de protamine dans l'IPZ^R est la plus élevée, mais la Durasuline^R, moins antigénique que la NPH^R, en contient deux fois plus. Donc, nous ne pouvons pas retenir, comme facteur favorisant l'élaboration d'anticorps, les principes chimiques utilisés pour prolonger l'action de l'insuline.

5. Rôle des peptides insulín-like dans la préparation galénique :

MIRSKY incrimine, en 1966, la présence de désamidoinsulines comme élément inducteur d'anticorps (69).

STEINER (96) procède à une filtration sur gel Sephadex et sépare trois fractions. Les fractions a et b de P.M. supérieur à 6000 et la fraction c de P.M. = 6000.

La fraction "a" contient surtout des protéines d'origine pancréatique animale et induit chez le lapin des anticorps antiinsuline (92). De même, la fraction "b", qui renferme la proinsuline, provoque l'apparition d'anticorps. La fraction "c" se compose d'insuline pure, d'arginyl insuline, de désamidoinsuline et de l'insulinéthylester : par chromatographie avec échange d'ions, on isole l'insuline pure ou "monocomposée". La fraction "c" injectée au lapin lui fait produire très peu d'anticorps. Les dérivés arginyl et éthylinsuline sont bien responsables de ces anticorps, puisque l'injection de ces deux peptides immunisent le lapin contre l'insuline. Au contraire, l'insuline monocomposée ne déclenche pas l'apparition de globulines immunes.

Les procédés modernes de séparation de l'insuline traditionnelle ont permis d'isoler l'insuline très pure débarrassée de ses impuretés : protéines étrangères, proinsuline et peptides insulín-like. L'expérimentation de SCHLICHTKRULL (90) et les premiers essais obtenus chez l'homme font

tique d'insuline monocomposée. L'affinité des anticorps va diminuer : ils vont libérer l'insuline transportée. L'hypoglycémie brutale, imprévisible, oblige à la surveillance étroite du malade, affirme l'efficacité de l'insuline monocomposée et impose de diminuer les besoins en hormone. De mois en mois, les anticorps du sérum vont diminuer avant de disparaître totalement, puisque l'introduction d'antigène, sous forme de peptides insuline-like, n'entretient plus l'immunisation.

Cependant, si les anticorps antiinsuline peuvent contribuer à une équilibration difficile du diabète, il ne faut pas pour autant leur en faire assumer toute la responsabilité. Avant de penser aux anticorps antiinsuline, les causes classiques sont toujours à rechercher : erreurs alimentaires, thérapeutiques, infectieuses, métaboliques, psychiques.

Pour FEDERLIN (30), une fixation de 30 % peut être responsable d'un déséquilibre du diabète, voire d'une résistance à la thérapeutique.

En fait, la recherche systématique des anticorps antiinsuline, chez le diabétique II, nous a montré des cas différents : certains diabétiques sont bien équilibrés et possèdent un taux élevé entre 20 et 30 % d'anticorps : ils sont peu nombreux ; d'autres présentent des épisodes d'hypoglycémie dont l'origine échappe à l'interrogatoire et à un examen minutieux ; d'autres encore nécessitent, en quelques semaines, des besoins accrus en insuline : chaque fois, on pouvait suspecter une fixation élevée d'IgG à l'insuline. Le résultat du laboratoire ne confirmait pas toujours cette hypothèse. Mais, dans les cas où le diabétique mal équilibré a la "chance" d'avoir des anticorps de haute affinité, il peut bénéficier de l'insuline de porc monocomposée. Les besoins en insuline, les anticorps diminuent et, du point de vue clinique, le malade retrouve un meilleur équilibre métabolique. L'utilisation de monocomposée, lorsqu'elle rétablit l'équilibre du diabète et fait chuter les anticorps, tendrait à prouver qu'ils peuvent être responsables d'instabilité.

3. Anticorps et complications du diabète :

Des études entreprises chez l'animal laisseraient entrevoir un effet pathogénique des anticorps dans la microangiopathie diabétique.

MANCINI trouve, chez des cobayes immunisés par une insuline hétérologue de boeuf, des lésions de glomerulosclérose nodulaire semblables à celles de la néphropathie de KIMMELSTIEL WILSON (65).

WELNER et ANDERS examinent le volume du mésangium rénal, le nombre des cellules glomérulaires de 30 reins de diabétiques (105). L'augmentation du mésangium s'élève à 47 % par rapport aux témoins normaux et se caractérise par une corrélation positive avec le titre des anticorps antiinsuline. Ils émettent l'hypothèse qu'un processus de l'immunité dans le mésangium soit occasionné par le complexe insuline-antiinsuline et entraîne cette variation.

WELNER et HÜBER (106) étudient, chez 90 lapins immunisés avec les fractions (a + b) et c de l'insuline, d'une part les anticorps antiinsuline induits et d'autre part les modifications de la membrane basale glomérulaire au microscope électronique. Les injections itératives de composés a et b provoquent l'élaboration d'anticorps et la formation de dépôts sur la membrane du glomérule rénal qui seraient constitués d'immuns complexes.

Ces trois faits expérimentaux posent donc le problème : les complications dégénératives du diabète sont-elles favorisées ou engendrées par l'existence de complexes insuline-anticorps antiinsuline ? Il est trop tôt aujourd'hui pour affirmer ou infirmer une telle hypothèse : la majorité des auteurs espèrent trouver la réponse par un procédé indirect. L'utilisation d'insuline monocomposée, très peu antigénique, va faire diminuer, voire disparaître, la conséquence de l'opothérapie que sont les anticorps antiinsuline. Une étude prospective, dans 15 à 20 ans, permettra de juger si la fréquence des complications dégénératives de la maladie diabétique est en nette régression.

4. Le diabète = maladie autoimmune

HIRATA, le premier, rapporte, en 1970, l'observation d'un patient qui n'a jamais reçu d'insuline et présente des hypoglycémies brutales, rattachées à la présence d'autoanticorps (44).

En 1972, six cas nouveaux sont présentés à la Société de Diabétologie au Japon. OHNEDA publie, en 1974, une observation similaire (74).

Ces observations possèdent, en commun, les points suivants :

- . pas d'injection d'insuline dans les antécédents,
- . épisodes d'hypoglycémie,
- . IgG immunes antiinsuline dans le sang,
- . hyperinsulinisme,
- . courbes d'hyperglycémie provoquée de type diabétique,
- . hypertrophie des îlots de Langerhans.

L'hypoglycémie s'explique par l'hyperinsulinisme engendré, soit par hypersécrétion, car l'insuline circulante est bloquée par les anticorps, soit par libérations brutales de l'insuline liée aux anticorps : ces deux mécanismes seraient probablement associés. Malgré l'hyperinsulinisme, l'insuline physiologiquement active est faible : ce qui expliquerait la courbe d'hyperglycémie de type diabétique.

Ces observations, où les anticorps dirigés contre l'insuline endogène précèdent le diabète, supposent donc une origine autoimmune de la maladie.

De plus, l'association diabète et maladies autoimmunes idiopathiques : Addison, Biermer, thyroïdite d'Hashimoto, n'est pas rare. Pour BASTENIE (10), le diabète diminuerait la réactivité des immunocytes et ainsi faciliterait le développement des processus d'autoimmunité.

Existe-t-il un rapport entre les anticorps antiinsuline induits par la thérapeutique, les autoanticorps antiinsuline endogène, les processus d'autoimmunité ? L'étude anatomopathologique de diabétiques jeunes rapportée par GEPTS (35) montre des lésions d'insulite, comparables à celles que réalise l'immunisation de l'animal par l'insuline exogène. La possibilité d'une origine virale de ces phénomènes d'autoimmunité est actuellement à l'étude (10).

- C O N C L U S I O N S -

Le but de notre travail est l'étude des anticorps antiinsuline chez le diabétique insulino-dépendant.

Nous avons choisi la méthode de dosage de CHRISTIANSEN : l'électro-immunodiffusion révèle la liaison de l'insuline marquée aux immunoglobulines G du sérum. Cette méthode sensible, seuil de détection 0,2 %, est reproductible : le coefficient de variation analytique oscille, pour les reproductibilités intra et intersystème, entre 10 et 16 %.

Nous avons vérifié la spécificité du système insuline-anticorps anti-insuline ; évalué à 0,3 % la réaction croisée de la proinsuline.

Les anticorps antiinsuline ont été titrés chez 528 sujets :

- . Les 88 témoins, n'ayant jamais reçu d'insuline, ne possèdent pas d'anticorps.
- . Trois mois d'insulinothérapie sont nécessaires à l'élaboration d'anticorps antiinsuline.

98,6 % des diabétiques insulino-dépendants synthétisent des anticorps, 56,8 % des malades possèdent des taux variant de 0,2 à 10 % : ce qui peut être considéré comme une réponse standard chez le diabétique II.

Il existe une liaison positive entre les besoins en hormone et le taux d'anticorps antiinsuline.

Parmi les insulines traditionnelles, l'Insuline Protamine Zinc^R est la plus immunogène ; ce pouvoir est accru si on l'associe à l'insuline ordinaire. La Durasuline^R et l'Insuline Zinc Mixte^R engendrent des taux plus faibles d'anticorps.

L'insuline monocomposée utilisée d'emblée provoque un taux moyen d'anticorps antiinsuline égal à 1,6 %, nettement inférieur à 20,8 %, taux moyen induit par une insuline traditionnelle, pour des durées d'immunisation identiques.

Lorsqu'on remplace l'insuline traditionnelle par l'insuline monocomposée les résultats obtenus, chez 27 malades, sont élargis à une population plus importante (intervalle de confiance du pourcentage).

La chute significative des anticorps est notée dans 73 % à 98 % des cas.

La diminution simultanée des anticorps et des besoins en insuline est notée dans 58,8 à 89,7 % des cas.

L'insuline monocomposée agit sur la constante d'affinité pour l'insuline de la première population d'anticorps, alors que la deuxième population d'anticorps ne joue qu'un rôle modeste (99). L'insuline monocomposée n'induit pas, ou très peu, d'anticorps antiproinsuline : taux moyen 0,7 %, en comparaison des insulines traditionnelles 22,1 %.

Les anticorps antiproinsuline ne lient pas l'insuline injectée au diabétique. Ils ne seraient donc pas responsables de l'augmentation des besoins en hormone. Ils pourraient signifier que des molécules de haut poids moléculaire : proinsuline, insuline-like, sont les inducteurs de l'immunisation.

Tous ces résultats indiquent que l'utilisation des insulines monocomposées doit être large, d'autant que le rôle des anticorps antiinsuline n'est pas élucidé.

Si, après vingt ans d'utilisation des insulines monocomposées, la fréquence des complications dégénératives du diabète est en régression, l'hypothèse de maladie des complexes immuns serait confirmée.

Le Directeur de l'U.E.R.
SUD-OUEST
Pr. J. NORMAND

Le Président de la Thèse :
Pr. M. PLAUCHU

Vu et permis d'imprimer
LYON, le 13 JUIN 1977

Le Président de l'Université Claude Bernard : Pr. D. GERMAIN

- B I B L I O G R A P H I E -

1. ANDERSEN O.O. - BRUNFELDT K. - ABILDGARD F.
A method for quantitative determination of insulin antibodies in human plasma.
Acta endocrinologica - 1972 - 69 - 195.208

2. ANDREANI D. - IAVICOLI M. - TAMBURRANO G. - MENZINGER G.
Comparative trials with M.C. and M.S. pork insulins in the treatment of diabetes mellitus. Influence on antibody levels, on insulin requirement and on some complications.
Horm. Metab. Research. - Nov. 1974 - n° 6 - 447.454

3. ANTONIADES H.N.
Bound Insulin and tissue resistance to insulin.
The Lancet. July 1965 - 24 - 159

4. ARQUILLA E.R.
Immunological studies of insulin.
Coll. Endocr. London Churchill - 1964 - 14 - 146.168

5. ASSAN R. - ROSSELIN G. - TCHOBROUTSKY G. - DEROT M.
Antigénicité de l'insuline.
Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol. - 1967 - XII - 20.36

6. AUBERTIN E.
Antagonistes de l'insuline.
Journal de Médecine de Bordeaux - Oct. 1962 - 1275

7. AUBERTIN E. et J.
Insulinothérapies inutiles et d'ailleurs inefficaces.
Le Diabète - 1965 - 3 - 97.103

8. AZERAD E. - LUBETZKI - ROUFFY - LAFFAY - BURGUIERE
Histoire purement clinique d'une insulino-résistance.
Le Diabète - 1963 - 5 - 11ème année

9. AZERAD E.
Insulinorésistance thérapeutique et biologique.
Le Diabète - 1973 Fév.Mars - 39.50

10. BASTENIE P.A.
Diabète et maladies autoimmunitaires.
Diabète et métabolisme - 1975 - 1 - 3.6

11. BERSON S.A. - YALOW R. - BAUMAN - ROTHSCHILD - NEWERLY
Insulin ¹³¹I. metabolism in human subjects : demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.
J. Clin. Invest. - 1956 - 35 - 170

12. BIZOLLON C.A. - FAURE A.
Critères et contrôle de la qualité d'un dosage radioimmunologique.
Lyon Pharm. - 1976 - 27 - 135.144

13. BRUNFELDT K. - DECKERT
Antibodies in the pig against pig insulin.
Acta endocr. - 1964 - 47 - 367.370

14. BRUNI B. - CASTELLAZZI R. - OSENDA M. - TURCO G.L.
Serum IgG ¹²⁵I insulin binding capacity in long term insulin treated diabetics as an indication for M.C. insulin therapy.
Panminerva Medica - 1973 July-August - 15 - 231.237

15. CANIVET J. - QUICHAUD J. - MANTEL O. - RAMBERT P.
Un cas d'insulinorésistance à l'insuline de boeuf par anticorps neutralisants avec sensibilité normale à l'insuline de porc.
Sté Médicale Hôpitaux de Paris - 1961 - 77 - 178

16. CHANCE R.E.
Amino acid séquenas of proinsulin and intermediates.
Diabetes - 1972 - 21 (suppl.2) 461.467

17. CHETTY M.P. - WATSON K.C.
Antibody-like activity in diabetic and normal serum- measured by complement consumption.
The Lancet - 1965 January - 9 - p.67

18. CHRISTIANSEN H.
A new method for determination of insulin binding immunoglobulins in insulin treated diabetic patients.
Horm. Metab. Res. - 1970 - 2 - 187

19. CHRISTIANSEN H.
Radioimmunoélectrophoresis in the determination of insulin binding to IgG.
Horm. Metab. Res. - 1973 - 5 - 147.154

20. CREIGHTON W.D. - LAMBERT P.H. - MIESCHER P.A.
Detection of antibodies and soluble antigen antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol.
The Journal of Immunology - Oct. 1973 - 11 - 1219.1227

21. CZYZYK A. - ROGALA H. - SYMONIDES - LAWECKA A. - LAWECKI J.
L'infection et l'immunoréactivité à l'égard de l'insuline.
Journées Diabétiques Hôtel Dieu Paris 1976 - 45.58

22. DECKERT - GRUNDAHL
The antigenicity of pig insulin.
Diabetologia - 1970 - 6 - 15.20

23. DECKERT T. - ANDERSEN - GRUNDAHL
Isoimmunisation of man by recrystallized human insulin.
Diabetologia - 1972 - 8 - 358.361

24. DECKERT T
Insulin antibodies.
Thesis Munksgaard, Copenhagen, Denmark - 1964.

25. DEROT M.
Méthode radioimmunochimique : ses intérêts.
Journées annuelles de Diabétologie - 1965 -

26. DEVLIN J.G.
Immunologic response to monocomponent insulin in newly diagnosed diabetic patients.
Journal of the Irish Medical Association - 1975 June - 68 - 301.305

27. DUNLOP M. - COURT J.M.
The measurement of total plasma insulin and insulin antibody levels in diabetic children.
Clin. Chim. Acta - 1974 - 52 - 353.359

- 27 bis. EKINS R.P.
Theoretical aspects of saturation analysis.
"In vitro procedure with radioisotopes in Medicine"
IAEA - Vienne - 1970 - 325

28. FANKHAUSER S. - MICHL J.
Deux années de traitement de diabétiques avec l'insuline "monocomposée".
Congrès international du Danube, Salzbourg 10.11.12 Sept. 1973 - 1.4.

29. FAULK W.P. - KARAM J.H. - FUDENBERG H.H.
Human antiinsulin antibodies.
The Journal of Immunology 1971 - 106 - 1112.1116

30. FEDERLIN
Immunopathology of insulin.
Springer N.Y. - 1971

31. FOLLING - NORMAN
Hyperglycemia hypoglycemic attacks and production of antiinsulin antibodies without previous known immunization - Immunological and fonctional studies in a patient.
Diabetes - 1972 - 21 n° 7 - 814.826

32. FORETTE B.
Antigénicité de l'insuline.
5ème symposium de Megève - 8.9.10 Mars 1974 - 253.257

33. FRANCHIMONT P.
Les principes généraux des dosages radioimmunologiques.
Ann. Biol. Clin. - 1970 - 28 - 3.14

34. GALLOWAY J. - ROOT M.A.
New forms of Insulin.
Diabetes 1972 - 21 (supp.2) 637.648

35. GEPTS W.
Diabetes - 1965 - 14 - 619

36. GRAND G. - BOUR H.
Rôle éventuel du tissu adipeux dans l'insulinorésistance et la physiopathologie du diabète chez l'obèse.
Journées de Diabétologie - 1972.

37. GRODSKY G.M. - FORSHAM P.H.
An immunochemical assay of total extractable insulin in man.
J. Clin. Invest. - 1960 - 39 - 1070.1079

38. GRODSKY G.M. - FORSHAM P.H.
Comparative binding of beef and human insulin to insulin antibodies produced in man and guinea pigs.
Journal Clin. Invest. - 1961 - 40 - 799.802

39. GRÜNEKLEE D. - TAKAISHY T - DAWEKE H.
 Insulin resistenz.
 Münch. Med. Wochenschrift - 1970 - 112 - 1278

40. GRÜNEKLEE D. - TAKAISHY T. - DAWEKE H.
 Insulin antikörpertiter.
 Münch. Med. Wochenschrift - 1970 - 112 - 1287

41. HAHN G.J.
 Additional factors for calculating prediction intervals for samples
 from a normal distribution.
 Journal of the American Statistical Association - Dec.1970 - 65 - 1668.1676

42. HALES C.N. - RANDLE P.J.
 Immunoassay of Insulin with Insulin antibody precipitate.
 Biochemical Journal - 1963 - 88 - 137

43. HEDING L.G.
 Determination of total serum insulin in insulin treated diabetic
 patients.
 Diabetologia - 1972 - 8 - 260.266

44. HIRATA Y. - ISHIZU H. - OUCHI N. - MOTONURA S.
 Insulin autoimmunity in a case with spontaneous hypoglycemia.
 Tonyobyō - 1970 - 13 - 312.319

45. HIRATA Y. - ISHIZU H.
 Elevated insulin-binding capacity of serum proteins in a case with
 spontaneous hypoglycemia and mild diabetes not treated with insulin.
 Tohoku J. Exp. Med. - 1972 - 107 - 277.286

46. IRVINE W.J. - CLARKE B.F. - SCARTH L. - CULLEN D.R. - DUNCAN L.J.P.
 Thyroid and gastric autoimmunity in patients with diabetes mellitus.
 The Lancet - 25 July 1970 - 162.171

47. JACOTOT B. - NAVARRO N. - DELPLANQUE B. - LE PARCO J.C. - BEAUMONT J.L.
 Diabète gras = Insulinorésistance et anticorps antiinsuline.
 Nouvelle Presse Médicale - 28 avril 1973 - 2 - 1121.1124

48. JORGENSEN R. - DECKERT T. - MOLSTED L.P.
 Insulin, insulin antibody and glucose in plasma of newborn infants
 of diabetic women.
 Acta endocrinologica - 1966 - 52 - 154.167

49. KARAM J.H. - GEROLD M.D. - GRODSKY M. - FORSHAM P.H.
 Insulin resistant diabetes with autoantibodies induced by exogenous insulin. Successful treatment by insulin withdrawal.
 Diabetes - 1969 - 18 n° 7 - 445.454

50. KAWAZU S. - KANAZAWA Y. - HAJINUMA H. - MIKI E.
 Demonstration of anti "a-component" antibody - A possible means to differentiate patients with autoantibodies to endogenous insulin from insulin treated patients.
 Diabetologia - 1975 - 11 - 169.173

51. KERP L.
 Quantitative data concerning the localization of antibody binding sites of insulin and proinsulin molecules.
 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. - 1971 - 41 - 216.218

52. KERP L. - STEINHILBER S. - KASEMIR H.
 Besitzt die Proinsulin. vereinigung kommerzieller Insulinpräparate Bedeutung für die Stimulierung von Insulinanti körpern.
 Klin. Wochenschr. - 1970 - 48 - 884.885

53. KERP W. - LEVETT R.E.
 Experiences with monocomponent insulin.
 Wiener Klinische Wochenschrift - 1973 - 85 - 326.330

54. KUMAR D. - MEHTALIA S.D. and MILLER L.V.
 Antigenicity of monocomponent porcine Insulin in Rabbits.
 Horm. Metab. Res. - 1974 - 6 - 175.177

55. KUMAR D. - MILLER L.V.
 Proinsulin specific antibodies in human sera.
 Diabetes - 1973 - 22 - 361.366

- 56.. KUMAR D. MILLER L.V.
 The prevalence of Proinsulin specific antibodies in diabetic patients.
 Horm. Metab. Res. - 1973 - 5 - 1.3.

57. LARCAN A.
 L'insulinorésistance.
 Journées diabétologie, Hôtel Dieu de Paris - 1962 - 21.41

58. LAURELL C.B.
 Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.
 Anal. Biochem. - 1966 - 15 - 45.52

59. LESTRADET H.

Le diabète sucré = maladie ou syndrome ?

Nouvelle Presse Médicale - 1972 - n° 38 1 - 2555

60. LEVETT R.E. - KORP W.

Neue aspekte der insulintherapie. Monocomponent Insuline.

3 Internationales Donau-Symposium über diabetes mellitus, Salzburg 10.12 Sept.73

61. LOWELL

Evidence for the existence of two antibodies for cristalline insulin.

Pro. Soc. Exper. Bio. and Med. - 1942 - 50 - 167

62. LOWELL

Measurement of an insulin antagonist in the serum of an insulin resistant patient by the blood sugar curve method in mice.

J. Clin. Invest - 1947 - 26 - 57.63

63. LUYCKX A. - DAUBRESSE J.C. - LEFEBVRE P.

L'intérêt des insulines M.C. dans le traitement du diabète.

Médecine et Hygiène - 1974 - 32 - 1283.1286

64. MANCINI A. - ZAMPA G.A. - VECCHI A. - COTANZI G.

Histo immunological techniques for detecting antiinsulin antibodies in human sera.

The Lancet - 1965 - 1 - 1189

65. MANCINI A. - ZAMPA G.A. - GEMINIANI G.D. - VECCHI A.

Experimental nodular "diabetic-like" glomerulosclerosis in guinea pigs following long acting, heterologous insulin immunization.

Diabetologia - 1969 - 5 - 155.166

66. MICHL - FANKHAUSER

The antigenicity of different depot insulin preparations in diabetic patients.

Abstr. n° 134 of the 6th annual meeting of the EASD Warsaw 1970.

67. MIROUZE J.

Efficacité et tolérance à long terme des traitements antidiabétiques.

Nouvelle Presse Médicale - 15 Juin 1974 - 3 n° 24 - 1551.1554

68. MIROUZE J. - ORSETTI A. - SCHMOUKER Y. - CARTRY E. - ALMES N.

Diabète sucré : son traitement par les insulines purifiées monocomposées.

Nouvelle Presse Médicale - 25 août 1973 - 2 - 1981.1985

69. MIRSKY A. - KAWAMURA K.

Heterogeneity of cristalline insulin.

Endocrinology January-Juin 1966 - 78 - 1115.1119

70. MOLONEY P.J.
Endogenous and pancreatic insulins.
Coll.Endocr. London Churchill 1964 - 14 - 169.177
71. MOXNESS K. - MOLNAR G.D. - TAYLOR W.F. - OWEN Ch.A.
Studies of diabetic instability - Immunoassay of human insulin in plasma containing antibodies to pork and beef insulin.
Metabolism - 1971 - 20 - n° 12
72. NAKAGAWA S. - SASAKI T. - YOSHINO K. - YING YU Y.
A simple method for the determination of serum free insulin levels in insulin treated patients.
Diabetes - 1973 - 22 - 590.600
73. NERUP J. - BENDIXEN G. - BINDET G.
Autoimmunity in diabetes mellitus.
The Lancet - 1970 - 2 - 610
74. OHNEDA A. - MATSUDA K. - SATO M. - YAMAGATA S.
Hypoglycemia due to apparent autoantibodies to insulin.
Diabetes - 1974 - 23 - 41.50
75. PENCHER - ANDREEV D. - DITZOF S.
Insulin precipitating antibodies in insulin treated and untreated diabetics.
Diabetologia - 1968 - 4 - 164
76. PFEIFFER E.F.
Signification biologique du transport et des liaisons de l'insuline endogène et exogène.
J. Diabetologie - Hôtel Dieu de Paris 1964.
77. POWER
Etude de la nature de l'insuline circulante.
Journées Diabétologie - Hôtel Dieu Paris 1966.
78. PROSZYNSKA K. - SADOWSKA B.
Adsorption onto dextran-coated charcoal as a rapid method for 125 I labelled insulin damage assessment.
Clin. Chim. Acta. - 1974 - 53 - 5.10
79. RASMUSSEN S.M. - HEDING L.G. - PARBST E. - VOLUND Aa.
Serum IRI in insulin treated diabetics during a 24 hour period.
Diabetologia - 1975 - 11 - 151.158

80. RENOLD A. - SOELDNER J. - STEINKE J.
Immunological studies with homologous and heterologous pancreatic insulin in the cow.
Ciba Foundation Colloquium of Endocrinology, London - 1964 - 15 - 122.137
81. RENOLD A. - SOELDNER J. - STEINKE J.
The aetiology of diabetes mellitus and its complications
Ciba Foundation Colloquium of Endocrinology, London - 1964 - vol.15 - 122
82. RENOLD A. - STEINKE J. - SOELDNER J. - ANTONIADES H.
Immunological response to the prolonged administration of heterologous and homologous insulin in cattle.
J. of Chir. Invest - 1966 - 45 - 702.713
83. ROOT M.A. - CHANCE R.E. - GALLOWAY J.A.
Immunogenicity of Insulin.
Diabetes - 1972 - 21 (suppl.2) - 657.660
84. ROSSELIN G.
La régulation de la sécrétion d'insuline, aspects biochimiques et physiologiques.
Revue du Praticien - 1969 - 25 Mars.
85. ROSSELIN G. - TCHOBRUTSKY G. - ASSAN R. - LELLOUCH J. - DEROT M.
Etude radioimmunologique de la réaction insuline anticorps antiinsuline.
Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol. - 1965 - X - 1045.1063
86. ROSSELIN G. - TCHOBRUTSKY G. - ASSAN R. - DROUET J. - DOLAIS J. - DEROT M.
La méthode radioimmunologique d'étude des hormones protéiques de Berson et Yalow.
Ann. Endocr. - 1965 - 26 - 449.464
87. ROSSELIN G.
Hormones - Anticorps antihormones.
Bordet - 1974 - 379.452
88. RUBENSTEIN A.H. - STEINER D.F. - CHO S. - LAWRENCE A.M.
Immunological properties of bovine proinsulin and related fractions.
Diabetes - 1969 - 18 - 598.605
89. SCHLICHTKRULL J. - BRANGE J. - HALLUND O. - CHRISTIANSEN A.H. - HEDING H.G. - JORGENSEN K.H.
Highly purified insulin for therapy.
Lecture faite à la 8ème réunion annuelle d'association suisse du diabète - Lausanne 1972 - 1.17

90. SCHLICHTKRULL J. - BRANGE J. - CHRISTIANSEN A.H. - HALLUND O. - HEDING L.G.
Monocomponent insulin and its clinical implications.
Horm. and Metab. Res. - 5 (suppl.) 134.143
91. SCHLICHTKRULL J. - BRANGE J. - CHRISTIANSEN A.H. - HALLUND D. - HEDING L.G.
JORGENSEN K.H.
Clinical aspects of insulin antigenicity.
Diabetes 1972 - 21 (suppl.2) 649.656
92. SCHLICHTKRULL J.
L'insuline à un composant : son importance clinique.
5è EFF Copp. Lecture 16 march 1973.
93. SEBRIAKOVA M. - LITTLE J.A.
A method for the determination of plasma insulin antibodies and its
application in normal and diabetic subjects.
Diabetes - 1973 - 22 - 30.40
94. SIGNORELLI S.
La résistance à l'insuline : phénomène biologique et phénomène clinique.
Journées Diabétologie - Hôtel Dieu Paris - 1969 - 369.386
95. SIRAKOV - DITZOV.
Quantitative determination of insulin binding antibodies in human serum.
Clinica Chimica Acta - 1973 - 45 - 145.151
96. STEINER D.F.
Isolation and properties of proinsulin.
Intermediate forms and other minor components form cristallin bovin.
Diabetes - 1968 - 18 - 725.733
97. STEINER D.F. - CLARK J.L. - RUBENSTEIN A.H. - MELANI F. - OYER P.E. - CHO S.
Biosynthèse et structure de la proinsuline et produits dérivés.
Symposium de diabétologie - Megève 13.14.15 Mars 1970 - 1.22
98. STOWERS J.M.
Insulin antibodies
Postgrad Med. J. - 1969 - 45 - 32.39
99. TCHOBROUTSKY G. - ASSAN R. - ROSSELIN G. - Melle DOLAIS - DEROT M.
Les anticorps antiinsuline chez l'homme : étude radioimmunologique.
Journées de Diabétologie de l'Hôtel Dieu de Paris - 1965 - 31.56
100. TCHOBROUTSKY G.
Insulinorésistance : anticorps antiinsuline chez l'homme.
Path. Biol. - 1966 - 14 - 619.627

101. TCHOBRUTSKY G. - ASSAN R. - TUTIN M. - HAUTECOUVERTURE M. - SLAMA G.
Comment faire progresser la thérapeutique antidiabétique ?
Nouvelle Presse Médicale - 1974 - 3 n° 21 - 1379.1382

102. TEUSCHER A.
Treatment of insulin lipoatrophy with monocomponent insulin.
Diabetologia - 1974 - 10 - 211.214

103. VALLERON
Méthodes statistiques en radioimmunologie.
Techniques radioimmunologiques.
Séminaire INSERM - Hôpital St Antoine - Paris 1972 - p.149

104. WALDHÄUSL W.
Insulinbindende Antikörper und Insulinresistenz .
Wiener Klinische Wochenschrift - 1973 - 51 - 833.836

105. WEHNER H. - ANDERS E.
Quantitativ morphologische Analyse glomerulärer Veränderungen bei Diabetikern.
Diabetologia - 1970 - 6 - 505.511

106. WEHNER - HUBER - KRONENBERG
The glomerular basement membrane of the rabbit kidney on long term treatment with heterologous insulin preparations of different purity.
Diabetologia - 1973 - 9 - 255.263

107. WELBORN T.A. - RICHARDS R. - FRASER T.R.
Simple test for insulin antibodies in sera, using ¹³¹I, insulin and ethanol precipitation.
British Medical Journal - 25 March 1967 - 1 - 719.722

108. YALOW R.S. - BERSON S.A.
Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin - binding antibody -
Radioisotope service, Veterans Administration Hospital Bronx N.Y.
1959 - 16 - 1996.2016

109. YALOW R.S. - BERSON S.A.
Immunologic aspects of insulin.
Amer. J. Med. - 1961 - 31 - 882.891

110. YALOW R.S.
Applications of immunologic methodology to problems in diabetes.
Perspectives in diabetic research.
Publication Veterans Administration Hospital Bronx N.Y. - 10.12

111. YUE D.K. - TURTLE J.R.
Antigenicity of monocomponent pork insulin in diabetic subjects.
Diabetes 1975 - 24 - 625.632
112. ZIEGLER M. - LIPPMANN H.G.
Insulinantikörper.
Acta Biol. Med. Germ. - 1972 - 29 - 281.288

- T A B L E D E S M A T I E R E S -

INTRODUCTION

Chapitre I : GENERALITES

- I - HISTORIQUE DES ANTICORPS ANTIINSULINE
- II - NOTION D'ANTICORPS
- III - NATURE DES ANTICORPS ANTIINSULINE
- IV - LA REACTION ANTIGENE ANTICORPS
- V - LES MODELES MATHEMATIQUES DE LA REACTION INSULINE -
ANTICORPS ANTIINSULINE
- VI - METHODE DE DETECTION DES ANTICORPS CIRCULANTS.

Chapitre II : METHODOLOGIE

- I - L'ELECTROIMMUNODIFFUSION
 - a. Principe
 - b. Matériel
 - c. Méthode
- II - EXPRESSION DES RESULTATS
- III - CARACTERES DE LA METHODE DE CHRISTIANSEN
 - a. Sensibilité
 - b. Reproductibilité
 - 1. intrasystème
 - 2. intersystème
 - 3. étude de la dilution d'un sérum d'activité anticorps élevée
 - c. Spécificité
 - 1. interférence non spécifique
 - 2. interférence spécifique
 - a. conditions pratiques
 - b. représentation graphique
 - c. résultats
 - 1. insuline
 - 2. proinsuline
 - 3. peptide C

DISCUSSION

Chapitre III : RESULTATS

Première partie : ANTICORPS ANTIINSULINE CHEZ 528 SUJETS

- Gr. I : sujets témoins
- Gr. II : diabétiques traités depuis moins de 3 mois
- Gr. III : diabétiques II traités depuis plus de 3 mois
- Gr. IV : primoinsulinés par les insulines traditionnelles et MC
- Gr. V : passage de l'insuline traditionnelle à l'insuline MC.

Deuxième partie : CONSTANTES D'AFFINITE ET SITES ANTICORPS

- Gr. I : diabétique II traités par l'insuline de boeuf
- Gr. II : diabétique II traités par l'insuline de porc
- Variations au cours du temps chez un malade.

Troisième partie : ANTICORPS ANTIPROINSULINE CHEZ 100 DIABETIQUES INSULINODEPENDANTS

- 1. Méthodes
- 2. Malades
- 3. Résultats
 - . Gr. I : témoins
 - . Gr. II : diabétiques II traités par l'insuline traditionnelle
 - . Gr. III : diabétiques II traités par l'insuline MC.

Chapitre IV : DISCUSSION

- A. DES RESULTATS
- B. FACTEURS EVENTUELLEMENT RESPONSABLES DE L'ELABORATION D'ANTICORPS
- C. INTERETS DE CETTE ETUDE ET PROBLEMES QU'ELLE POSE.

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

